Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr.med. E. Wecker

POSITIVE UND NEGATIVE SIGNALWIRKUNG VON ANTI-IMMUNGLOBULIN - ANTIKÖRPERN AUF B-LYMPHOZYTEN DER MAUS

Inaugural-Dissertation
verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Hans-Peter Tony
aus Bad Mergentheim

Würzburg, den 6. September 1982

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr.med. E. W e c k e r

POSITIVE UND NEGATIVE SIGNALWIRKUNG VON ANTI-IMMUNGLOBULIN - ANTIKÖRPERN AUF B-LYMPHOZYTEN DER MAUS

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Hans-Peter Tony
aus Bad Mergentheim

Würzburg, den 6. September 1982

Referent:	Professor Dr.med. E. Wecker
Korreferent:	Priv.Doz. Dr.med. I. Auer
Dekan:	Professor Dr.med. K.-A. Bushe

Tag der mündlichen Prüfung: 30.11.1982

UNIV. LEIDEN BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

Meiner lieben Frau

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543522_0047

A B K Ü R Z U N G E N

BSA	Rinderserumalbumin
BSS	Balanced Salt Solution
BSS(-)	BSS ohne Glukose
C'	Komplement
ConA	Concanavalin A
CR	Komplementrezeptor
$F(ab')_2$-	$F(ab')_2$ Fragment des Antikörpers
FcR	Fc-Rezeptor
FKS	Fötales Kälberserum
Ig	Immunglobulin
IgG / IgM	Immunglobulin der Klasse IgG bzw. IgM
Ipm	Impulse pro Minute
χ	Klasse kappa der leichten Ketten von Ig
KαMχ	Kaninchen-anti-Maus-kappa Antikörper
LPS	bakterielles Lipopolysaccharid
MΘ	adhärente Zellen (Makrophagen)
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PBZ	Plaque bildende Zellen
RIA	Radioimmunoassay
SRBC	Schafserythrozyten
ZαMμ	Ziege-anti-Maus-IgM Antikörper

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
I.	E I N L E I T U N G	1
II.	M A T E R I A L	5
	1. Mäuse	5
	2. Seren	5
	3. Lösungen und Nährmedien	6
III.	M E T H O D I K	8
	1. Zellkultur	8
	1.1. Milzzellsuspensionen nach Mishell und Dutton	8
	1.2. Kulturbedingungen	8
	1.3. Bestimmung der Zellzahlen im Coulter Counter	9
	1.4. Bestimmung des ^{3}H-Thymidineinbaues	9
	2. Behandlung von Milzzellen mit anti-Thy 1.2 und Kaninchenkomplement (RC')	9
	3. Entfernung der adhärenten Zellen durch Sephadex G-10 Filtration	10
	4. Autoradiographie	10
	5. Entfernung von IgD-tragenden Zellen aus einer Milzzellpopulation	12
	6. Reverser Plaquetest zur Messung von polyklonaler Antikörpersekretion	12
	7. Maturierung von anti-Immunglobulin-stimulierten Milzzellen mit Schaf-spezifischen Helfer-T-Zellen	13
	8. T-Zellanreicherung über Nylonwolle	14
	9. Hämolytischer Plaquetest nach Jerne	14

10. Gewinnung der IgG-Fraktion von Kaninchen-antiseren 15

11. Herstellung von $F(ab')_2$-Fragmenten 15

12. Herstellung von monovalentem F(ab')-anti-IgM - Antikörper 16

13. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese 16

14. Herstellung eines anti-IgM - Immunosorbens durch Glutaraldehydaktivierung von AH-Sepharose 4 B 17

15. Reinigung von Maus-IgM durch Affinitäts-chromatographie an anti-IgM-Sepharose 4 B 18

16. ^{125}J-Markierung von Maus-IgM - Antikörpern

17. Solid phase Radioimmunoassay 19

18. Fluoreszenzmarkierung von monoklonalen Maus-IgM - Antikörpern 19

19. Direkte Immunfluoreszenz von Mausmilz-zellen mit FTC-markiertem anti-IgD - Antiserum 20

IV. ERGEBNISSE 21

1. Versuche zur Aktivierung der DNS-Synthese mit anti-Immunglobulinseren 21

1.1. Rolle des Humanserums bei der Aktivierung von Mausmilzzellen durch anti-Maus-Ig-Seren

1.1.1. ^{3}H-Thymidineinbau in durch anti-Maus-Ig-Antikörper aktivierte Milzzellen in Gegenwart von Humanserum bzw. FKS 21

1.1.2. Hemmung der durch $Z\alpha M\mu$ - Immunglobulin induzierten DNA-Synthese durch der Kultur zugesetztes IgM bzw. κ - Kette 23

1.1.3. Einfluß von Humanserum und FKS auf die Aktivierung von Mausmilzzellen mit $Z\alpha M\mu$ - Antikörpern 23

1.1.4. Kinetik der anti-Immunglobulinstimulation von Mausmilzzellen 26

1.1.5. Altersabhängigkeit der Stimulation von Mausmilzzellen durch anti-Immunglobulin-Antikörper 26

1.2. Beteiligung von B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und adhärenten Zellen bei der Stimulation von Mausmilzzellen durch anti-Immunglobulinantikörper 26

1.2.1. Stimulation von nu/nu Milzzellen mit anti-Immunglobulinseren 29

1.2.2. Die Rolle der adhärenten Zellen bei der anti-Immunglobulinstimulation von Mausmilzzellen 29

1.3. Autoradiographische Studien zur Aktivierung von Mausmilzzellen mit anti-Immunglobulinseren 32

1.3.1. Einbau von ^{14}C-Thymidin in B-Lymphozyten einer nu/nu Maus 32

2. Rolle des Fc-Rezeptors bei der Aktivierung von Maus-B-Lymphozyten durch anti-Immunglobulinseren 34

2.1. Stimulation von Mausmilzzellen mit ZαMu - und KαMu - Seren 34

2.2. Änderung der stimulierenden Aktivität von Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulinseren durch enzymatische Abspaltung des Fc-Teiles und Dissoziation in monovalente Antikörperfragmente 36

2.3. Komplexierung des Fc-Teiles von Kaninchen-anti-Maus-kappa-Antikörpern mit Protein A und dessen Einfluß auf die Aktivierung von Maus Milzzellen 38

2.4. Einfluß von intaktem Kaninchen-anti-Maus-kappa-Antikörper auf die Stimulation von Mausmilzzellen durch Ziegen-F(ab')$_2$-anti-Mausμ- Antikörper bzw. Kaninchen-F(ab')$_2$-anti-Maus-kappa - Antikörper 40

2.5. Nachweis des negativen Signals, vermittelt durch den Fc-Rezeptor, mit Hilfe eines Antikörpers, der gegen den stimulierenden Antikörper gerichtet ist 41

2.6. Nachweis des negativen Signals über den Fc-Rezeptor bei Ziegen-anti-Immunglobulinseren 47

3. Rolle des IgD-Rezeptors bei der Aktivierung von Maus B-Lymphozyten 49

3.1. Stimulation von Maus Milzzellen mit anti-Maus-IgD - Antikörpern 49

3.2. Spezifität der Stimulation von Maus Milzzellen durch anti-IgD-Antikörper 51

3.3. Stimulation von Maus Milzzellen mit anti-IgD-Antikörpern nach Entfernung der T-Lymphozyten 54

3.4. Stimulation von Maus B-Lymphozyten mit anti-kappa- bzw. anti-IgM-Antikörpern nach Entfernung der IgD-positiven B-Zellen 54

4. Versuche zur Darstellung der sequentiellen Proliferation und Maturierung von Maus B-Lymphozyten 57

4.1. Stimulation von Maus Milzzellen mit $F(ab')_2$-anti-Maus-kappa- bzw. anti-IgD-Antikörpern 58

4.2. Stimulation von Maus B-Lymphozyten mit anti-Immunglobulin-Antikörpern 60

4.3. Maturierungsversuche 60

V. DISKUSSION 64

VI. ZUSAMMENFASSUNG 78

LITERATURVERZEICHNIS I - V

I. EINLEITUNG

Der Aufbau des Immunsystems aus B- und T-Lymphozyten ist schon seit langem bekannt. Trotzdem sind erst in letzter Zeit einige der vielfältigen Interaktionen innerhalb dieses Systems aufgedeckt worden (27, 28).

Die humoralen Antikörper werden von B-Lymphozyten produziert, die sich von Stammzellen im Knochenmark ableiten und bei Vögeln in der Bursa fabricii, bei Säugetieren in den sogenannten Bursaäquivalenten antigenunabhängig zu immunkompetenten B-Zellen differenzieren.

Diese B-Lymphozyten besitzen auf ihrer Zelloberfläche antigenspezifische Rezeptoren in Form von Immunglobulinen. Jeder B-Lymphozyt ist dabei für eine bestimmte antigene Determinante des in den Organismus eindringenden Fremdantigens spezifisch (29).

Die sogenannte "zellvermittelte" Immunreaktion wird durch Lymphozyten vermittelt, die ebenfalls von Stammzellen im Knochenmark abstammen, aber im Thymus zu immunkompetenten T-Zellen heranreifen. Darüber hinaus greifen T-Zellen als Helfer- oder Suppressor-T-Zellen regulierend in den Prozeß der Antikörperbildung durch B-Lymphozyten ein (30, 31). Die Struktur des Antigenrezeptors der T-Zellen ist noch ungeklärt.

Der funktionellen Verschiedenheit innerhalb der T-Lymphozyten steht bei den B-Zellen nur die Antikörperproduktion und Sekretion als Aufgabe gegenüber. Wenn man sich aber die Tatsache verschiedener Funktionen einzelner Antikörperklassen sowohl in der Effektorphase als sezernierte Antikörper als auch in der Aktivierungsphase als Oberflächenimmunglobuline vergegenwärtigt, erkennt man auch eine Heterogenität innerhalb der B-Lymphozytenpopulation.

Als wichtige Oberflächenmarker besitzt die B-Zelle außer dem Oberflächen-Immunglobulin auch einen Rezeptor für den Fc-Teil von Immunglobulinen (FcR) (32) und einen Komple-

mentrezeptor (CR) (33). Diese drei Rezeptoren sind allerdings auf Plasmazellen, dem Endprodukt der B-Zelldifferenzierung, nicht mehr nachweisbar (32). Nur auf Plasmazellen vorhanden sind dagegen Marker wie PC-1, MSPCA und Ala-1 (34, 35). Auf allen B-Zellen scheinen auch MBLA (37), Ly4 (36), Ia und H-2 als Oberflächenstrukturen vorhanden zu sein.

Die Mehrzahl der B-Zellen innerhalb der Zellpopulation einer erwachsenen Mausmilz tragen sowohl IgM- als auch IgD-Rezeptoren (38, 39). Es werden auch kleine Subpopulationen beschrieben, die nur IgM, nur IgD oder andere Isotypen wie IgG als Oberflächen Immunglobuline tragen sollen (40 - 44). In Mäusen, jünger als 6 Tage, tragen über 90 % der B-Zellen nur IgM als Membranimmunglobulin (45). Aber auch hier scheint es so, als ob die sowohl durch thymusunabhängige als auch durch thymusabhängige Antigene aktivierbare B-Zellpopulation sowohl IgM als auch IgD exprimiert (46).

Die Rolle der Oberflächenimmunglobuline als Rezeptoren zur Aktivierung der B-Zellen durch Antigene war lange nicht unwidersprochen. Besonders Coutinho und Möller (12) entwickelten eine Theorie, in der die Immunglobulinrezeptoren das Antigen nur auf der Oberfläche fokusieren sollten, das Aktivierungssignal aber über andere Strukturen erfolgen sollte. Für die Lösung dieses Problems schienen anti-Immunglobulin-Antikörper geeignet. In der Tat konnten im Kaninchen- und Humansystem (9, 10) B-Zellen durch anti-Immunglobulin aktiviert werden. Im Maussystem schlugen jedoch lange Zeit entsprechende Versuche fehl. Das wiederum wurde als Hinweis für die Theorie von Coutinho und Möller gewertet. Nur zwei Arbeiten widersprachen den bisherigen Ergebnissen im Maussystem.

Parker konnte mit an Polyacrylamidkügelchen gekoppeltem anti-Immunglobulin Maus-B-Zellen aktivieren (13), und der Gruppe um Weiner (14) gelang die Aktivierung mit löslichem anti-Immunglobulin, wenn die B-Zellen von Tieren, die älter als sieben Monate waren, stammten. Doch auch diese Ergebnis-

se blieben nicht unwidersprochen (15) in dem Sinne, daß nämlich die Polyacrylamidkügelchen durch das anti-Immunglobulin so fokusiert würden, um als polyklonale Aktivatoren zu wirken.

Aus Versuchen mit den Antigenen SRBC (2, 3) und später DNP-KLH (4, 5) im Maussystem schlugen Schimpl und Wecker ein Modell der B-Zellaktivierung vor: Danach muß die B-Zelle mindestens drei Reaktionsschritte durchlaufen, bevor sie zur Antikörperproduktion differenzieren kann.

Der erste wäre der Kontakt des Antigens mit dem spezifischen Immunglobulinrezeptor. Als zweiter wäre ein Signal zur fortdauernden Proliferation notwendig (1). Diese sich teilenden "intermediären" B-Zellen würden nicht automatisch zu Antikörperproduzenten differenzieren, sondern dazu wäre ein antigenunspezifisches T-Zellprodukt, der T-Zellen ersetzende Faktor (TRF), notwendig (6, 7).

Um die Gültigkeit dieses Modells zu untersuchen, nämlich die Funktion des Immunglobulinrezeptors als Aktivierungsrezeptor für die Induktion der Zellteilung, gefolgt von getrennten Signalen für Proliferation und Differenzierung zur Immunglobulinproduktion, schien die Verwendung von anti-Immunglobulinen erfolgversprechend. Zusätzlich sollte ein solcher Versuchsansatz es ermöglichen, die biochemischen Vorgänge der Wirkung von TRF aufzudecken. Wenn man sich nämlich vergegenwärtigt, daß jede B-Zelle klonal für nur eine bestimmte von $10^6 - 10^8$ möglichen Antikörperspezifitäten festgelegt ist, erkennt man leicht, daß mit einem bestimmten Antigen bestenfalls 0,1 % aller B-Zellen aktiviert werden können. Da die Zahl der jeweils reagierenden Zellen im Vergleich zu den nicht aktivierten verschwindend gering ist, ist es auf diese Weise unmöglich, die biochemischen Vorgänge der Wirkung von TRF zu studieren. Deshalb wäre eine polyklonale Aktivierung von B-Zellen nur zur Proliferation mit anti-Immunglobulin und anschließende Differenzierung dieser Zellen mit TRF für sol-

che Experimente ideal.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wird deshalb die Frage untersucht, ob und unter welchen Bedingungen eine Proliferation von Maus-B-Zellen durch anti-Immunglobulin-antikörper erreicht werden kann.

Der zweite Teil befaßt sich mit der Frage der Regulation dieser Aktivierung, insbesondere mit der Rolle des Fc-Rezeptors, auf die bereits Sinclair hingewiesen hat (19).

Im dritten Teil soll noch die Rolle des IgD-Rezeptors und das Problem der sequentiellen Proliferation und Maturierung untersucht werden.

II. MATERIAL

1. Mäuse:

Balb c: Mäuseinzuchtstamm; am Institut gezüchtet von Elterntieren von Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME oder gekauft von Gl. Bomholtgård, Ry, Dänemark

C 57 Bl/6: am Institut gezüchtet; Elterntiere von Jackson Laboratories

nu/nu ("nude") Mäuse:
rückgekreuzt auf Balb/c:
Mäuse mit kongenitaler Thymusaplasie
(Bomholtgård, Ry, Dänemark)

Es wurden in der Regel weibliche Tiere im Alter von 12 Wochen verwendet.

2. Seren:

Ziege-anti-Maus-IgM Antiserum (ZαMIgM)

Kaninchen-anti-Ziege 7 S Antiserum (KαZ 7 S):
Meloy Laboratories (Mediapharm, Aschaffenburg)

Kaninchen-anti-Maus-kappa Antiserum (KαMχ):
Bionetics Laboratories (Fresenius, Oberursel)

anti-Maus- IgD Antiserum:
sera-lab MAS 009 a

Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin:
Dako Z 109 (Boehringer, Ingelheim)

3. Lösungen und Nährmedien:

BSS (Balanced Salt Solution):
Phosphat-gepufferte Salzlösung nach Mishell und Dutton (25)

PBS (Phosphate-buffered Saline):
Phosphat-gepufferte Salzlösung nach Dulbecco und Vogt (16)

Medium RPMI 1640:
Mediapharm, Aschaffenburg, Kat.Nr. RPM 2640, pro 100 ml ergänzt mit 1 ml Na-Pyruvat 100 mM, 1 ml Na-Glutamat 200 mM, 1 ml Non Essential Amino Acids Mixture 100 fach konzentriert (alle von Microbiol. Assoc.), $2 \cdot 10^4$ I.E. Penicillin G (Hoechst) und 1 ml $5 \cdot 10^{-3}$ M 2-Mercaptoäthanol.
In der Regel wurden dann noch 2,5 % Humanserum oder Fötales Kälberserum (FKS) zugesetzt.

Futter für die Zellkultur:
Medium C nach Mishell und Dutton (25), mit Serum 2 : 1 gemischt

Entwickler für die Autoradiographie (26):
3,4 g Amidol, 13,5 g Na_2SO_3, 26,3 g Borsäure, 6 ml 10 % KBr in H_2O, ad 1,5 l mit H_2O

Gebrauchspuffer für Giemsafärbung:
86 ml 0,1 M Zitronensäure, 115 ml 0,2 M Na_2HPO_4, ad 1 l H_2O

Giemsa-Färbelösung:
115 ml Gebrauchspuffer, 3,75 ml Methanol, 6,25 ml Giemsa-Stammlösung gemischt und filtriert

Grundlösung für 18 %iges SDS-Gel:

18 g Acrylamid, 250 mg Bisacrylamid,
25 ml 1,5 M Tris/HCl pH 8,8,
ad 100 ml H_2O

Probenpuffer für SDS-Gelelektrophorese:

2 ml 10 % Na-Dodecylsulfat (SDS),
0,3 ml 0,5 M Tris/HCl pH 6,8,
6 ml 10 M Harnstoff, 1 ml Glycerin,
2 mg Bromphenolblau und bei reduzierenden Bedingungen 1 ml 2-Mercaptoäthanol

Elektrodenpuffer für SDS-Gelelektrophorese:

7,6 g Tris-hydroxy-aminomethan,
36 g Glycin, 2,5 g SDS ad 2,5 l mit H_2O;
mit HCl pH auf 8,3 eingestellt

III. METHODEN

1. ZELLKULTUR

1.1. Milzzellsuspensionen nach Mishell und Dutton (25)

Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet, die Milzen steril entnommen und in einer Petrischale (60 mm ø), die etwa 5 ml BSS enthielt, von Bindegewebsresten befreit. Die gesäuberten Milzen wurden in eine zweite Schale mit frischem BSS gebracht und durch ein Stahlsieb gerieben. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen (50 ml) überführt, mit BSS auf 20 ml verdünnt und 10 Minuten auf Eis gestellt, um Zellklumpen und Gewebsreste absitzen zu lassen. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette in ein neues Zentrifugenröhrchen (50 ml) gebracht, 10 Minuten mit 167 g bei 4°C zentrifugiert und das Zellsediment 2mal mit 5 ml BSS/Milz gewaschen. Danach wurden die Zellen in wenig RPMI 1640 Medium aufgenommen und gut suspendiert. Die Zelldichte wurde im Coulter Counter bestimmt. Die Suspension wurde dann auf die jeweils gewünschte Zelldichte verdünnt und, wenn nicht anders angegeben, mit 2,5 % Serum versetzt.

1.2. Kulturbedingungen

Von der fertigen Milzzellsuspension wurden in der Regel 100 µl in Mikrotiterplatten (U-Form) eingesät. Anschließend wurden die jeweils angegebenen Zusätze zupipettiert und mit Medium so aufgefüllt, daß das Endvolumen von 150 µl entstand. Es wurden jeweils 3 gleiche Parallelkulturen angesetzt. Die Kulturen wurden bei 37°C bei hoher Luftfeuchtigkeit und 10 % CO_2 inkubiert. Alle Arbeiten an den Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt.

1.3. Bestimmung der Zellzahlen im Coulter Counter

Zu 10 ml Isoton (isotonischer Elektrolyt von Coulter Electronics) wurden 20 µl der zu zählenden Zellsuspension und 3 Tropfen Zaponin (hämolytisches Reagenz der Firma Coulter Electronics) gegeben und nach 5 Minuten bei Raumtemperatur gezählt.

1.4. Bestimmung des ^{3}H-Thymidineinbaues

Zu jedem Napf der Zellkulturen in Mikrotiterplatten wurden für die letzten 20 Stunden der Kultur 0,25 µCi ^{3}H-Thymidin in 25 µl Medium gegeben. Nach Kulturende wurden die Zellen auf Glasfiberfilter mit einem Mash II geerntet, die Zellen durch Wasserlyse zerstört. Dabei wurde die DNS mit dem bei ihrer Replikation eingebauten ^{3}H-Thymidin an die Filter adsorbiert. Die Filterplättchen wurden 2 Stunden bei 80°C getrocknet und danach in Zählröhrchen mit je 5 ml PPO/POPOP im Scintillationsspektrometer ausgewertet. Von dem Ergebnis wurden die Ipm der Kontrollkultur, die nur Medium erhalten hatte, abgezogen und aus den 3 Parallelansätzen der Mittelwert mit Standardabweichung berechnet. Die jeweilige Basisproliferation in unstimulierten Kulturen wurde jeweils in den Legenden angegeben.

2. BEHANDLUNG VON MILZZELLEN MIT ANTI-THY 1.2 UND KANINCHENKOMPLEMENT (RC')

Zunächst wurde wie beschrieben eine Milzzellsuspension hergestellt. Nach der zweiten Zentrifugation in BSS wurden je $6 \cdot 10^{7}$ Zellen in 1 ml der anti-Thy 1.2 Ascitesflüssigkeit (1 : 5 verdünnt) suspendiert und 30 Minuten auf Eis gestellt. Die Suspension wurde dann mit BSS auf mindestens das doppelte Volumen verdünnt, abzentrifugiert (167 g, 10 Minuten, 4°C) und das Sediment in 1 ml RC' (Kaninchenserum 1 : 5 verdünnt und mit 40 mg Agarose pro ml eine Stunde bei 4°C ab-

sorbiert) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde 45 Minuten bei 37°C geschüttelt, 2mal mit BSS gewaschen, gezählt und für die Kultur vorbereitet.

3. ENTFERNUNG DER ADHÄRENTEN ZELLEN DURCH SEPHADEX G - 10 FILTRATION (21)

Sephadex G-10 wurde in physiologischer Kochsalzlösung gequollen und autoklaviert. Eine 50 ml Spritze, die mit 10 g Glasperlen gefüllt war und mit einem Silikonschlauch und Klemme versehen war, wurde ebenfalls autoklaviert. 35 ml Sephadex G-10 wurden nun vorsichtig und blasenfrei in die Spritze gepackt. Anschließend wurde die Säule mit 150 ml BSS, das 2,5 % des später zur Kultur verwendeten Serums enthielt, äquilibriert. Anschließend wurden 5 ml Zellen ($3 \cdot 10^7$/ml) vorsichtig aufgetragen, die man langsam einsickern ließ. Danach wurde die Säule für 20 Minuten abgestellt und dann mit BSS 2,5 % Serum langsam gespült. Es wurden 50 ml Durchlauf gesammelt (der Durchlauf war dann wieder klar). Die Zellen im Durchlauf wurden 2mal mit BSS gewaschen und anschließend die Zellzahl für die Kultur in Medium und 2,5 % Serum eingestellt. Zellausbeute etwa 30 %.

4. AUTORADIOGRAPHIE (26)

Nachdem die Zellen in Kultur mit ^{14}C-Thymidin markiert waren, wurden sie mit einer Pasteurpipette in Eppendorfhütchen übergeführt und dort zweimal in PBS mit 100 µg kaltem Thymidin/ml gewaschen. Von den gewaschenen Zellen wurden jeweils $1 \cdot 10^5$ in 0,5 ml Agarose (0,5 %ig) in BSS auf einen mit 0,05 %iger Agarose in H_2O vorbeschichteten Objektträger gebettet. Wenn die Agarose fest war, wurden die Zellen für 10 Minuten in 0,5 %igem Glutaraldehyd fixiert. Nach 3maligem Waschen mit destilliertem Wasser (etwa 5 min) wurden die Präparate luftgetrocknet und in der Dunkelkammer mit einer

Photoemulsion (Ilford K 2) beschichtet. Dazu wurde die Photoemulsion bei schwachem Rotlicht (15 Watt) in der Dunkelkammer in einem Wasserbad bei 42°C geschmolzen und nach 30 Minuten in eine Küvette überführt, die im Wasserbad bei 30°C gehalten wurde. Nach 10 Minuten wurden die zu beschichtenden Objektträger bis kurz unter das Mattschild in die Emulsion getaucht und langsam wieder herausgezogen. Die Rückseiten der Objektträger wurden abgewischt und die Präparate möglichst senkrecht zum Trocknen aufgestellt. Nach 2 bis 3 Stunden Trocknungszeit konnten sie in eine lichtdichte Kammer überführt werden. Die Expositionszeit betrug 7 Tage bei 4°C. Die Autoradiogramme wurden 20 Minuten bei +12°C in der Dunkelheit entwickelt, bei Raumtermperatur in 30 %igem $Na_2S_2O_3$ fixiert und 90 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen.

- Giemsafärbung

Die entwickelten luftgetrockneten Autoradiogramme wurden in der folgenden Reihenfolge je 3 min gewaschen:

1) 50 % Äthanol
2) 96 % Äthanol
3) Gebrauchspuffer
4) 50 % Äthanol
5) 96 % Äthanol
6) Gebrauchspuffer
7) Gebrauchspuffer

Anschließend wurden die Präparate 20 Minuten mit Giemsafärbelösung gefärbt, nach Auswaschen der überschüssigen Färbelösung mit Gebrauchspuffer und Wasser luftgetrocknet.

- Auswertung

Bei einer Vergrößerung von 1 : 1250 wurden unter dem Mikroskop pro Autoradiogramm 400 Lymphozyten ausgezählt. Dabei wurden als positiv nur solche Zellen betrachtet, über denen eine beträchtlich hohe Dichte an Silberkörnern in der Gelatine über den Zellen vorlag.

5. ENTFERNUNG VON IgD-TRAGENDEN ZELLEN AUS EINER MILZZELLPOPULATION

Nach Herstellung einer Milzzellsuspension wurden die Zellen mit BSS, das $2 \cdot 10^{-2}$ M Na Azid enthielt, gewaschen und in demselben Puffer aufgenommen. Zu je $6 \cdot 10^{7}$ Zellen wurde 1 ml des moenoklonalen anti-IgD Antikörpers in der angegebenen Verdünnung (optimal 1 : 1000) gegeben, suspendiert und 30 Minuten auf Eis gestellt. Die Suspension wurde dann mit BSS $2 \cdot 10^{-2}$ M Na Azid auf das dreifache Volumen verdünnt, abzentrifugiert und das Sediment in 1 ml Kaninchenkomplement (Low-Tox-Rabbit Complement, Cederlane), 1 : 4 verdünnt, aufgenommen. Die Zellsuspension wurde 45 Minuten bei 37°C geschüttelt, 1x mit BSS gewaschen und je 3 ml auf 12 ml Ficoll (Dichte 1,087) überschichtet. Danach wurden die Zellen für 30 Minuten bei 1800 Upm und 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann abgenommen und 3mal mit BSS gewaschen und in Kultur gebracht.

6. REVERSER PLAQUETEST ZUR MESSUNG VON POLYKLONALER ANTIKÖRPERSEKRETION (60)

0,5 ml SRBC (3mal in 1 % NaCl gewaschen) wurden mit 0,5 ml Kaninchen-anti-Maus Immunglobulin (Dako; 800 µg spez. Antikörper/ml), 1 : 5 verdünnt in 1 % NaCl, und 0,5 ml frisch zubereitetem $CrCl_3$ (1 mg/ml in 0,01 M Na Acetat, 1 % NaCl) gemischt, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die SRBC 1mal mit 1 % NaCl, dann 2mal mit HBSS gewaschen. Diese Kaninchen-anti-Maus-SRBC wurden 10 %ig für den Test verwendet.
Dazu wurden zu 0,8 ml 0,8 %iger seaplaque agarose (in HBSS + 0,75 mg/ml DEAE-Dextran), die bei 37°C flüssig gehalten wurde, 100 µl der 10 %igen Kaninchen-anti-Maus-Ig-SRBZ Lösung und 100 µl der zu testenden Zellen (1 : 10, 1 : 30 und 1 : 90 verdünnt) gemischt und auf eine Petrischale (60 mm ø),

die vorher mit 4 ml 1 %iger Agaroselösung beschichtet wurde, ausgegossen. Nachdem die Agarose erstarrt war, wurde sie mit 1 ml BSS überschichtet und bei 37°C inkubiert. Nach 2 Stunden wurde das BSS abgegossen und mit 1 ml Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin (Dako) 1 : 20 verdünnt überschichtet und wieder für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Petrischalen mit Meerschweinchenkomplement (Meerschweinchenserum, mit SRBZ absorbiert und 1 : 8 in BSS verdünnt) für 1 Stunde überschichtet. Die Zahl der hämolytischen Plaques wurde gegen eine Lichtquelle gezählt und das Ergebnis als PBZ pro Million aus der Kultur wiedergewonnene kernhaltige Milzzellen angegeben.

7. MATURIERUNG VON ANTI-IMMUNGLOBULIN STIMULIERTEN MILZZELLEN MIT SCHAF-SPEZIFISCHEN HELFER T-ZELLEN

0,5 ml C 57 Bl/6 Milzzellen wurden mit $5 \cdot 10^6$ SRBC, 75 µl $F(ab')_2 \alpha$ IgM- bzw. 100 µl anti-IgD Antikörpern, 1 : 5000 verdünnt, oder Medium bei einer Zelldichte von 10^7/ml in Gegenwart von 2,5 % Humanserum in Gewebekulturplatten mit 24 Näpfen (Ø 15 mm, flacher Boden) kultiviert. Die Kulturen wurden in luftdichten Inkubationskammern mit einem Gemisch aus 7 % O_2, 10 % CO_2 und 83 % N_2 begast und bei 37°C auf einer Rockerplattform mit 7 Wippbewegungen pro Minute inkubiert. Alle 24 Stunden wurden die Näpfe der Gewebekulturplatten mit 1 Tropfen Futter (2 Teile Medium und 1 Teil Humanserum) versetzt. Am Tag 4 wurden gleichartige Ansätze gepoolt, zweimal gewaschen und $7 \cdot 10^6$ Zellen wurden in je vier syngene, sublethal (750 rad) bestrahlte Mäuse intravenös transferiert. Nach 7 Tagen wurden die Milzzellen gewonnen, auf $1 \cdot 10^7$/ml eingestellt und 0,25 ml davon in Gewebekulturplatten eingesät. Dazu wurden 0,25 ml ($1 \cdot 10^7$/ml) über Nylonwollesäulchen gelaufene Milzzellen von syngenen Mäusen gegeben, die 4 Tage vorher 10^8 SRBC intraperitoneal bekommen hatten. Zusätzlich bekamen die Kulturen noch $5 \cdot 10^6$ SRBC. Es wurden jeweils 2 Parallelnäpfe angesetzt. Am Ende

der Kultur (5 Tage) wurden die Zellen aus den Kulturplatten abpipettiert, die beiden Parallelansätze vereinigt und die Zellen einmal mit BSS gewaschen. Das Sediment wurde in 1 ml BSS aufgenommen und im hämolytischen Plaquetest nach Jerne auf anti-SRBC PBZ getestet.

8. T-ZELLANREICHERUNG ÜBER NYLONWOLLE (68)

600 mg Nylonwolle pro 10 ml Säule wurden autoklaviert und anschließend mit BSS luftblasenfrei gewaschen. Dann wurde die Säule mit Medium (5 % Serum) äquilibriert und darauf $1{,}5 \cdot 10^8$ Milzzellen in 1 ml BSS aufgetragen. Die Zellschicht ließ man etwa 1 cm einsickern. Inkubation bei 37°C für 1 Stunde. Dann wurden die Zellen mit Medium (5 % Serum) ausgewaschen, 3mal mit BSS gewaschen, in Medium aufgenommen und auf für die Kulturen notwendige Zellzahl gebracht.

9. HÄMOLYTISCHER PLAQUETEST NACH JERNE (22, 25)

0,5 %ige Agaroselösung in BSS wurde nach kurzem Aufkochen bei 45°C gehalten. Zu 0,5 ml Agaroselösung wurden 100 µl der zu prüfenden Zellsuspension und 50 µl 10 % SRBC-Suspension in BSS gegeben. Nach Zugabe der zu testenden Zellen wurde das Gemisch sofort auf Agarose-beschichtete Objektträger plattiert. Nachdem das Agarosegel sich verfestigt hatte, wurden die Objektträger mit BSS überschichtet und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie mit vorgewärmtem Meerschweinchenkomplement (Meerschweinchenserum, mit SRBC absorbiert und 1 : 15 in BSS verdünnt) bedeckt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Zahl der hämolytischen Plaques gezählt und das Ergebnis als anti-SRBC IgM-PBZ pro Million aus der Kultur wiedergewonnene, kernhaltige Milzzellen angegeben. Anschließend wurden die Objektträger für eine weitere Stunde mit einem 1 : 75 in Meerschweinchenkomplement verdünnten Kaninchen-anti-Maus-

Gammaglobulin Serum inkubiert. Die anschließende Zählung der hämolytischen Plaques ergibt die Summe IgM und IgG produzierender PBZ/10^6.

10. GEWINNUNG DER IgG-FRAKTION VON KANINCHENANTISEREN

Um aus Kaninchenantiseren die IgG-Fraktion zu erhalten, wurden 4 ml Antiserum auf eine Säule (Ø 2,5 cm · 25 cm) mit QAE-Sephadex A 50, die mit 0,1 M Tris pH 6,9 äquilibriert war, aufgetragen. Die IgG-Fraktion wurde mit einem 0,1 M Acetatpuffer pH 4,0 eluiert, sofort mit 1 M Tris neutralisiert und im Amiconkonzentrator 10fach konzentriert. Anschließend wurde die Proteinlösung gegen BSS(-) dialysiert. Nach jedem 2. Lauf wurde die Säule mit 0,1 M Acetatpuffer pH 4,0, 5 % Tween 80 gespült.

11. HERSTELLUNG VON $F(ab')_2$-FRAGMENTEN (69)

Die IgG-Fraktion des jeweiligen Antiserums wurde gegen 0,2 M Natriumacetatpuffer pH 4,5 dialysiert. Zu dieser Proteinlösung (25 mg/ml) wurde im selben Puffer gelöst Pepsin im Verhältnis 1 Teil Pepsin : 100 Teile Protein gegeben. Diese Mischung wurde unter ständiger Bewegung 20 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde der pH durch Zugabe von festem Tris auf pH 8-9 gebracht, um die Reaktion zu stoppen.
8 ml dieser Lösung wurden auf eine geeichte Sephadex G - 200 bzw. Ultrogel AcA 34 Säule (5 cm · 90 cm) gegeben. Puffer: 0,1 M Tris, 0,2 M NaCl 2 mM EdTA pH 7,7. Die Durchflußgeschwindigkeit beträgt etwa 40 sec/Tropfen. Die im $F(ab')_2$-Molekulargewichtsbereich liegenden Fraktionen wurden in einer Amiconkonzentrationskammer (Ø 43 mm Membran PM 10) auf etwa das Ausgangsvolumen konzentriert. Anschließend wurde die Lösung über eine Protein-A Sepharosesäule gegeben.

Der Durchlauf wurde im SDS-Gel 7 % (nicht reduzierend) und 18 %ig (unter reduzierenden Bedingungen) auf Reinheit der $F(ab')_2$-Fragmente geprüft. Es wurden nur solche $F(ab')_2$-Präparationen verwendet, die keinerlei nachweisbare Verunreinigung mit intaktem IgG aufwiesen.

12. HERSTELLUNG VON MONOVALENTEM F(ab')-ANTI-IgM ANTIKÖRPER (69)

Zu 3 ml einer $F(ab')_2$-anti-IgM Präparation (gut entgast und mit N_2 gesättigt) wurden 100 µl einer 0,06 M Dithiothreitollösung (entgast, N_2-gesättigt) gegeben. Nach Inkubation (1 Stunde bei Raumtemperatur) wurde das Gemisch im Eisbad abgekühlt und mit 3 ml 0,75 M Jodacetamid (entgast, N_2-gesättigt, eisgekühlt) versetzt. Die Mischung wurde mit Trimethylamin auf pH 8 gehalten. Nach 1 Stunde auf Eis wurde gegen BSS dialysiert. Dann wurde das monovalente F(ab')-Fragment auf einer Ultrogel AcA 54 - Säule (4 cm · 90 cm) abgetrennt (Puffer: 0,1 M Tris, 0,2 M NaCl 2 mM EdTA pH 7,7), im Amiconkonzentrator eingeengt und gegen Medium dialysiert.

13. SDS-POLYACRYLAMID GELELEKTROPHORESE (24)

Die Elektrophorese wurde im Flachgel: Dicke 1,5 mm, Fläche 14 · 11 cm durchgeführt.

Trenngel 18 %ig:
30 ml einer Grundlösung (siehe II.3., S. 7) wurden mit 0,3 ml 10 % SDS, 10 µl TEMED und 0,35 ml Ammoniumpersulfat (7 %) gemischt, in die Flachgelapparatur gegossen, mit Wasser überschichtet und polymerisieren lassen.

Trenngel 7 %ig:
7 ml Acrylamid-Bisacrylamid (30 : 0,8 w/w), 7,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8, 0,3 ml 10 % SDS, 15 ml H_2O, 15 µl TEMED und

0,15 ml 10 % Ammoniumpersulfat wurden wie oben verarbeitet.

Nachdem das Trenngel fest war, wurde ein 4 %iges Sammelgel darübergegossen:
1,33 ml 30 % Acrylamid, 2 ml 2 % Bisacrylamid, 0,1 ml 10 % SDS, 10 µl TEMED, 2,5 ml 0,5 M Tris/HCl pH 6,8, 3,86 ml H_2O und 0,2 ml 7 % Ammoniumpersulfat.

Die Proben wurden in 30 µl bis 100 µl Probenpuffer aufgenommen und 5 Minuten in kochendem Wasser erhitzt. Der Lauf erfolgte bei 4 mA und 180 V im Trenngel.

Nach der Elektrophorese wurden die Flachgele mit Coomassie Brilliant Blau (66) gefärbt.

14. HERSTELLUNG EINES ANTI-IgM IMMUNOSORBENS DURCH GLUTARALDEHYDAKTIVIERUNG VON AH-SEPHAROSE 4 B (58)

Für eine 13 ml Säule, Ø 0,9 cm, wurden 13 ml in 0,1 M $NaHCO_3$ - Puffer pH 8,5 gequollener 6-Aminohexylsepharose 4 B auf einer Glasfritte mit 150 ml Puffer gewaschen. Zu dem gepackten Gel wurde unter ständigem Rühren 30 ml desselben Puffers gegeben, der 4,3 ml einer 25 % Glutaraldehydlösung enthielt (Endkonzentration ca. 2,5 %). Bei Raumtemperatur wurde 10 Minuten vorsichtig gerührt, der übrige Glutaraldehyd wurde dann durch Waschen mit 5 · 90 ml $NaHCO_3$ - Puffer pH 8,5 entfernt.

Zu 13 ml des so aktivierten Gels wurden 28,5 ml einer IgG-Fraktion von Ziege-anti-Maus-IgM Antiserum in 0,1 M $NaHCO_3$ - Puffer pH 8,5 (Proteinkonzentration 8,7 mg/ml) gegeben. Diese Mischung wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur vorsichtig gerührt. Danach wurde das Gel 5mal mit 90 ml $NaHCO_3$ - Puffer gewaschen; anschließend 3 Waschzyklen mit 90 ml 0,1 M Acetat-Puffer 1 M NaCl pH 4,0 und 90 ml 0,1 M Borat-Puffer 1 M NaCl pH 8. Danach wurde das Gel zur Absättigung von reaktiven Restgruppen für 16 Stunden bei 4^oC mit 0,2 M Äthanolaminpuffer pH 9,0 inkubiert, anschließend mit BSS(-) gewaschen

und äquilibriert. Die Proteinkonzentration in der Waschflüssigkeit nach Proteinkopplung wurde mit 27 mg bestimmt. Das entspricht einer Kopplungseffizienz von etwa 90 %.

15. REINIGUNG VON MAUS-IgM DURCH AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE AN ANTI-IgM-SEPHAROSE 4 B

5 ml normales Mausserum (gegen BSS(-) dialysiert) wurden auf die in Kap.III.14 beschriebene anti-IgM-Sepharose Säule mit einer Geschwindigkeit von 40 s/Tropfen aufgetragen. Die Säule wurde 30 min stehengelassen und dann mit 50 ml BSS(-) nachgespült. Schwach gebundenes Protein wurde mit 30 ml 0,4 M NaCl eluiert. Zur Eluation des an den Antikörper gebundenen Proteins wurde 3,5 M $MgCl_2$ (40 ml) genommen. Dieses Eluat wurde dann gegen Puffer (0,1 M Tris, 0,2 M NaCl, pH 8,2) dialysiert und anschließend mit einem Amiconkonzentrator (Membran PM 30) auf 4 ml konzentriert. Proteinkonzentration: 0,8 mg/ml. Im Ouchterloney-Test wurde eine Identitätslinie mit IgM (MOPC 104 E) gefunden.

16. ^{125}J-MARKIERUNG VON MAUS-IgM ANTIKÖRPERN (64)

Das aus normalem Mausserum hergestellte IgM (siehe III, 15.) wurde gegen PBS dialysiert. 150 µl der IgM-Lösung (100 µg IgM) wurden mit 1 mCi ^{125}J in 2,4 µl wäßriger Lösung (NEN 033 L) versetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 µg Chloramin T, frisch gelöst in 20 µl Phosphat-Puffer pH 7,2, gestartet. Nach 5 min vorsichtigem Schütteln bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl Natriummetabisulfid (1 mg/ml) und 200 µl einer 1 %igen Kaliumjodidlösung gestoppt.

Das Reaktionsgemisch wurde anschließend über eine 10 ml G-25 - Säule getrennt. Puffer: PBS mit 0,1 % BSA. Es wurden Fraktionen von 8 Tropfen aufgefangen. Von jeder Fraktion

wurden 5 µl in einem Gammaszintillator gemessen. Es ergaben sich zwei deutlich voneinander getrennte Radioaktivitätsmaxima. Im Ausschluß lief das jodierte IgM. Das ungebundene ^{125}J kam in einem zweiten, deutlich abgesetzten Radioaktivitätsmaximum von der Säule. Die Spitzenfraktionen wurden gepoolt. Aus der Radioaktivität dieser Spitzenfraktionen und der eingesetzten Proteinmenge ergab sich eine spezifische Aktivität von etwa 4000 ipm/ng.

17. SOLID PHASE RADIOIMMUNOASSAY (65)

Die zu untersuchenden Antiseren bzw. normales Ziegen-γ Globulin wurden in 4er-Schritten ab 1 : 4 bis 1 : 16 777 216 in 0,05 M $NaHCO_3$ - Puffer pH 9,5 verdünnt. 50 µl der jeweiligen Verdünnung wurden in Polystyrolnäpfchen pipettiert, kurz geschüttelt und zur Adsorption 15 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Näpfchen 4mal mit PBS 0,1 % Tween 20 gewaschen. Dann wurden 50 µl des in Kap.III.16 beschriebenen, auf 59000 ipm/50 µl verdünnten ^{125}J-IgM Antikörpers in die Näpfchen pipettiert, 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Näpfchen wurden 4mal mit PBS 0,1 % Tween 20 gewaschen und im Gammaszintillator gezählt. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Im Wendepunkt der S-förmigen Bindungskurve wurde die Tangente eingezeichnet. Die Tangenten waren bei allen getesteten Antikörpern parallel. Aus ihrer Verschiebung auf der Abszisse wurde der Titerunterschied abgelesen.

18. FLUORESZENZMARKIERUNG VON MONOKLONALEN MAUS-IgM ANTIKÖRPERN (70)

150 mg ε-Aminocapronsäure wurden in 1,5 ml Wasser gelöst. Dazu wurden 0,5 ml Pyridin und 4,5 ml DMF (N.N'-Dimethylformamid) gegeben und gut gemischt. 100 mg FITC (Fluorescein-

iso-thiocyanat Isomer I) wurden in 0,5 ml DMF gelöst, zur obigen Mischung gegeben und durch vorsichtiges Erwärmen gelöst. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 16 Stunden wurden ca. 50 ml 0,05 M Essigsäure zugegeben. Es bildete sich ein roter öliger Rest, der mit Wasser gewaschen und anschließend 2mal aus Azeton/Wasser umkristallisiert wurde. Dazu wurde in warmem Azeton/Wasser 19 : 1 gelöst und tropfenweise Wasser zugegeben, bis zur Auskristallisation. Die Kristalle wurden danach im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 85 mg orange, polymorphe FTC-Kristalle (Fluoreszeinyl-thioureido-capronsäure).

1 ml αIgD-Antiserum (10 mg/ml) wurde in 0,1 M $NaHCO_3$ - Puffer pH 8 dialysiert. Dazu wurden 1 mg FTC in 1,5 ml $NaHCO_3$ - Puffer und 2 mg Carbodiimid in 0,5 ml desselben Puffers gegeben. Die Mischung wurde 4 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das nicht gebundene FTC mit Hilfe einer Sephadex G - 25 Säule abgetrennt. Das markierte Antiserum wurde gegen PBS dialysiert, mit 0,02 % Azid versetzt und im Kühlschrank gelagert.

19. DIREKTE IMMUNFLUORESZENZ VON MAUSMILZZELLEN MIT FTC-MARKIERTEM ANTI-IgD ANTISERUM

Milzzellen wurden 3mal mit BSS (8 % FKS) gewaschen. Zu $1 \cdot 10^6$ Zellen wurden 50 µl FTC-αIgD (1 : 1, 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20 und 1 : 40 verdünnt) gegeben, suspendiert und 30 Minuten auf Eis stehen gelassen. Danach wurden die Zellen 3mal mit PBS 8 % FKS gewaschen, in 50 µl suspendiert, auf einen Objektträger getropft, ein Deckglas aufgesetzt und im Fluoreszenzmikroskop ausgezählt (Leitz Fluoreszenzmikroskop mit Auflicht und Blauanregung, Vergrößerung 540fach).

IV. ERGEBNISSE

1. VERSUCHE ZUR AKTIVIERUNG DER DNS-SYNTHESE MIT ANTI-IMMUNGLOBULIN-SEREN

Ausgehend von den eingangs erwähnten Experimenten von Parker (13) und Weiner (14) im Maussystem wurde versucht, mit anti-Maus-Ig-Seren eine Steigerung der DNS-Syntheserate als Ausdruck der Proliferation von B-Zellen zu erreichen. Dies gelang, entgegen den Ergebnissen von Weiner (14), mit löslichen anti-Ig-Seren auch mit Zellen von Tieren, die wesentlich jünger als 7 Monate waren (Abb. 1).

Beim genauen Vergleich der Versuchsprotokolle ergaben sich hauptsächlich zwei Unterschiede. In dem vorliegenden Versuch wurden einerseits die Zellen in Gegenwart von Humanserum kultiviert, andererseits wurde ein Ziegen-anti-Maus-Ig-Antiserum zur Stimulation verwendet. Die bisher widersprüchlichen Versuche in der Literatur waren aber alle in Gegenwart von fötalem Kälberserum (FKS) und mit Kaninchen-anti-Maus-Ig-Antiserum durchgeführt worden. Von diesen beiden grundsätzlichen Unterschieden ausgehend wurden die folgenden Experimente konzipiert.

1.1. Rolle des Humanserums bei der Aktivierung von Mausmilzzellen durch anti-Maus-Ig-Seren

1.1.1. ^{3}H-Thymidineinbau in durch anti-Maus-Ig-Antikörper aktivierte Milzzellen in Gegenwart von Humanserum bzw. FKS

Milzzellen von 12 Wochen alten Balb c/nu^{+} - Mäusen wurden in zwei Gruppen, mit 2,5 % Humanserum bzw. FKS im Medium, kultiviert und mit ZαMμ - Antiserum bzw. LPS als Stimulans versetzt. Nach 48 Stunden wurde den Kulturen ^{3}H-Thymidin zugegeben, nach weiteren 18 Stunden wurden die Zellen geerntet und das in die DNS eingebaute ^{3}H-Thymidin bestimmt.

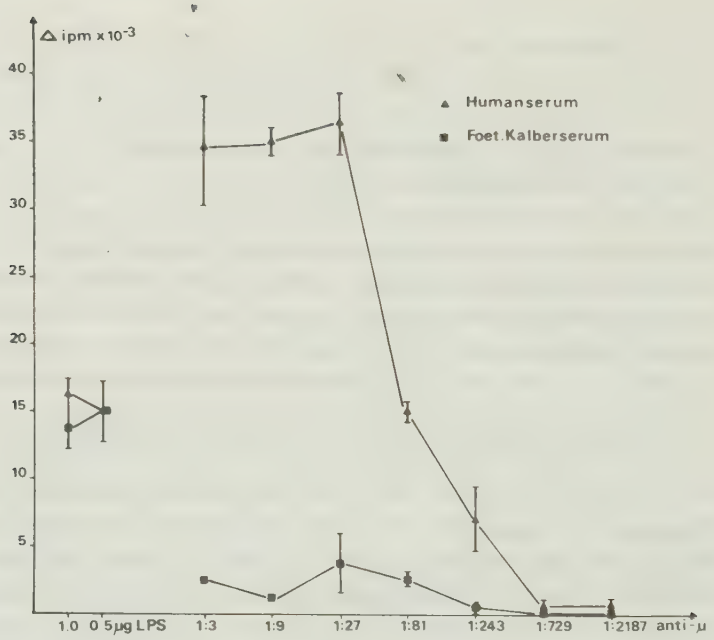

Abb. 1: ^{3}H-Thymidineinbau in durch anti-Immunglobulin-antikörper aktivierte Milzzellen in Gegenwart von Humanserum bzw. FKS

100 µl Balb c Milzzellen wurden bei einer Zelldichte von $5 \cdot 10^{6}$/ml in Gegenwart von 2,5 % Humanserum bzw. FKS nach Zugabe von 50 µl der angegebenen ZαMIgM-Antiserumverdünnung bzw. LPS-Verdünnung kultiviert. Bestimmung des ^{3}H-Thymidineinbaues nach 66 h. Pulsdauer 18 h. ^{3}H-Thymidineinbau nicht stimulierter Kulturansätze: Humanserum: 2437 ± 278 ipm; FKS: 2612 ± 273 ipm

Wie Abb. 1 zeigt, bauen die im Humanserum kultivierten Zellen in dosisabhängiger Form sehr gut ^{3}H-Thymidin ein, während bei Kultur mit FKS nur ein unbedeutender Einbau zu verzeichnen ist. Die mit dem B-Zellmitogen LPS aktivierten Zellen zeigen keinen Unterschied im ^{3}H-Thymidineinbau bei Kultur im Humanserum bzw. FKS. Nach diesem Ergebnis erscheint die Wahl des Serums im Kulturmedium als ein wich-

tiger Faktor für den Erfolg einer Aktivierung von Mausmilzzellen mit anti-Ig-Seren.

Daraus ergaben sich zunächst 3 Fragen:

1) Ist die Steigerung des ^{3}H-Thymidineinbaues überhaupt hervorgerufen durch die Bindung des Zαμ - Antikörpers an die IgM-Rezeptoren der B-Zelle?
2) Ist eine gute Stimulation direkt abhängig vom Humanserumgehalt der Kultur?
3) Hat das FKS eventuell einen negativen Effekt auf die Stimulation durch anti-Immunglobulin?

1.1.2. Hemmung der durch Zαμ - Immunglobulin induzierten DNA-Synthese durch der Kultur zugesetztes IgM bzw. κ - Kette

Milzzellen von C57 Bl/6 Mäusen wurden in Gegenwart von Humanserum mit Zαμ - Antikörpern versetzt. Gleich anschließend erhielten die Kulturen entweder IgM, IgG/κ Myelomprotein in verschiedenen Mengen oder Medium, als Kontrolle, zugesetzt. Nach 68 Stunden wurde dann der ^{3}H-Thymidineinbau bestimmt. Abb. 2 zeigt, daß die Aktivierung der Zellen durch Zαμ - Antikörper μ-spezifisch ist, da die Stimulation wohl durch IgM, nicht jedoch durch IgG oder κ - Kette hemmbar ist.

1.1.3. Einfluß von Humanserum und FKS auf die Aktivierung von Mausmilzzellen mit Zαμ - Antikörpern

Balb c/nu$^+$ Milzzellen wurden mit Zαμ - Antikörpern kultiviert. Parallel wurden dabei die Zellen mit steigendem Humanserum- bzw. fallendem FKS-Serumgehalt bei konstantem Totalserumgehalt von 2,5 % kultiviert.

Abb. 3a läßt einen linearen Anstieg der Stimulierbarkeit durch Zαμ - Antikörper mit der Menge an Humanserum erkennen. Mit 2,5 % Humanserum ist ein Optimum erreicht (Daten nicht gezeigt).

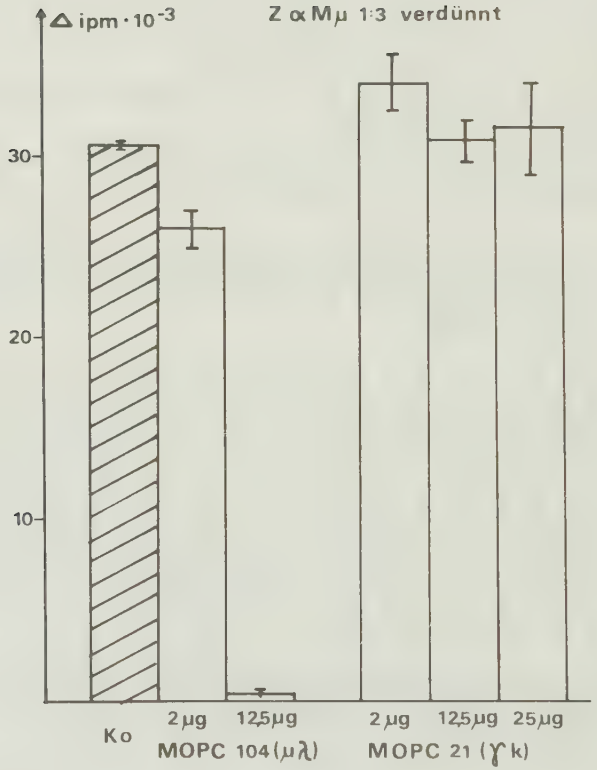

Abb. 2: Hemmung der durch ZαIgM-Antikörper induzierten DNA-Synthese durch Zusatz von IgM bzw. κ - Kette

100 µl Balb c Milzzellen ($2{,}5 \cdot 10^6$/ml; 2,5 % Humanserum) wurden mit 25 µl einer 1 : 10 Verdünnung von $F(ab')_2$αIgM Antikörpern und 25 µl der angegebenen Mengen von MOPC 104 E (μ, λ) oder MOPC 21 (γ, κ) kultiviert. Nach 68 h ^{3}H-Thymidineinbaubestimmung. Pulszeit 20 h. Basisstimulation: 895 ± 195 ipm

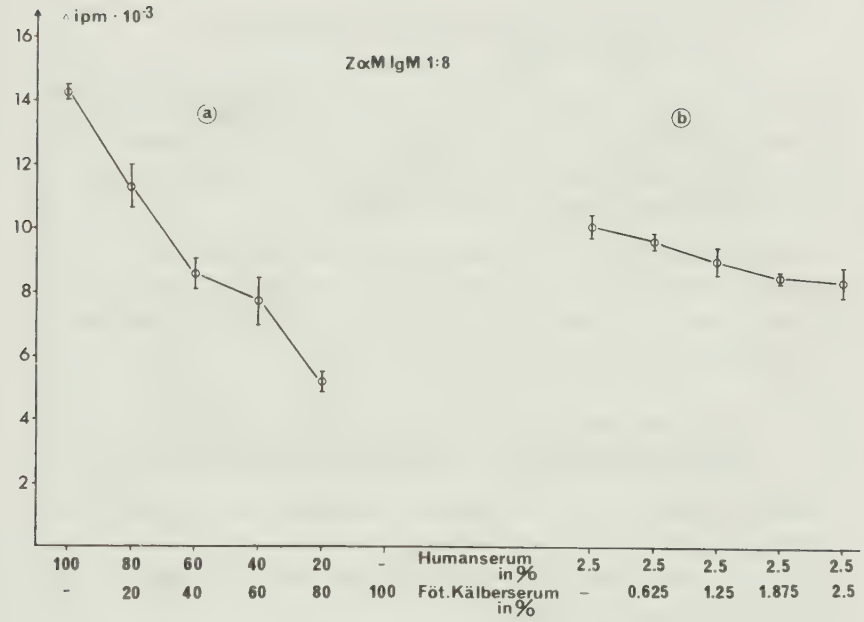

Abb. 3: Einfluß von Humanserum und FKS auf die Aktivierung von Mausmilzzellen mit ZαMμ - Antikörpern

100 µl Balb c/nu$^+$ Milzzellen bei Zelldichte von $5 \cdot 10^6$/ml kultiviert.

Bei Abb. 3a konstanter Gesamtserumgehalt von 2,5 %, jedoch unterschiedliche Mengen an Humanserum bzw. FKS; Abb. 3b Humanserumgehalt von 2,5 % konstant, zusätzlich steigende Mengen FKS. Zur Stimulation verwendet wurden jeweils 50 µl eines ZαMμ - Antikörpers, 1 : 8 verdünnt. Nach 68 h ^{3}H-Thymidineinbaubestimmung, 20 h Pulszeit. Basisstimulation zwischen 1000 und 1400 ipm.

Der entsprechende Versuch wurde auch durchgeführt unter Kulturbedingungen mit konstant 2,5 % Humanserum und steigenden Mengen FKS. In Abb. 3b zeigt sich, daß FKS auf die Aktivierung von Mausmilzzellen keinen negativen Einfluß ausübt.

1.1.4. Kinetik der anti-Immunglobulinstimulation von Mausmilzzellen

Balb c Milzzellen wurden entweder mit FKS oder Humanserum im Medium mit Zα/Mu - Antikörpern stimuliert. In beiden Gruppen wurde nach 44 Stunden, 68 Stunden, 92 Stunden bzw. 116 Stunden die DNA-Syntheserate bestimmt.

Aus Abb. 4 ersieht man, daß die Kinetik der Stimulation im Humanserum und im FKS gleichartig verläuft. Der beobachtete Stimulationsunterschied ist zu allen Zeitpunkten vorhanden.

1.1.5. Altersabhängigkeit der Stimulation von Mausmilzzellen durch anti-Immunglobulin-Antikörper

Weiner gelang es nur, Milzzellen von Mäusen, die älter als 7 Monate waren, mit anti-Immunglobulin zu aktivieren. Die obigen Versuche wurden jedoch alle mit Mäusen gemacht, die etwa 3 Monate alt waren.

Es wurden deshalb Mausmilzzellen verschiedener Altersklassen mit Zα/Mu - Antikörpern stimuliert. Abb. 5 zeigt, daß sich Milzzellen von Mäusen, die nur wenige Wochen alt sind, gut durch anti-Immunglobulin aktivieren lassen, wenn dem Medium Humanserum zugegeben wurde. Die Aktivierbarkeit der Milzzellen in FKS nimmt zwar mit dem Alter der Milzzellspender zu, der Reaktionsunterschied zwischen Kulturen in Humanserum bzw. FKS ist jedoch in allen Altersklassen vorhanden.

1.2. Beteiligung von B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und adhärenten Zellen bei der Stimulation von Mausmilzzellen durch anti-Immunglobulinantikörper

Die bisherigen Versuche wurden alle unter Verwendung der gesamten Milzzellpopulation durchgeführt. Es war nun als nächstes wichtig zu untersuchen, welche Zellarten auf

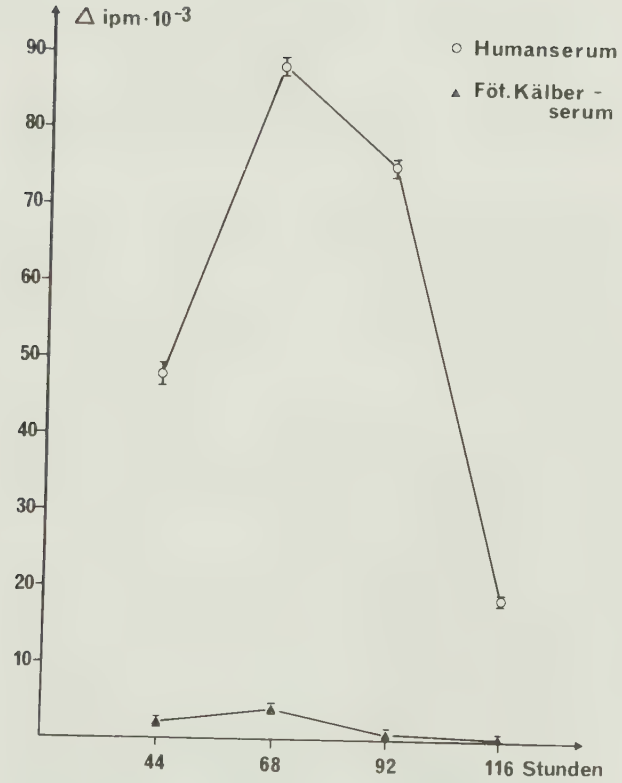

Abb. 4: Kinetik der anti-Immunglobulinstimulation von Mausmilzzellen

100 µl Balb c Milzzellen ($5 \cdot 10^6$/ml; 2,5 % Humanserum bzw. FKS, 50 µl ZαMIgM-Antikörper, 1 : 2 verdünnt)

^{3}H-Thymidineinbau bestimmt nach 44, 68, 92 und 116 h. Pulsdauer jeweils 20 h. Basisstimulation: 44 h : 1692 ± 381; 68 h: 2199 ± 872; 92 h: 1475 ± 211; 116 h: 872 ± 304 ipm

Abb. 5: Altersabhängigkeit der Stimulation von Mausmilzzellen durch anti-Immunglobulinantikörper

100 µl Balb c Milzzellen von Mäusen verschiedenen Alters wurden bei einer Zelldichte von $5 \cdot 10^6$/ml kultiviert (2,5 % Humanserum bzw. FKS). Zur Stimulation wurden jeweils 50 µl eines Zα(Mμ - Antikörpers 1 : 16 verwendet.

^{3}H-Thymidineinbaubestimmung nach 68 h bei einer Pulszeit von 18 h. Basisstimulation: 18 Wo Humanserum: 1932 ± 80, FKS: 1869 ± 94; 8 Wo Humanserum: 1915 ± 27, FKS: 1749 ± 29; 2 Wo Humanserum: 2083 ± 102, FKS: 2061 ± 99 ipm

anti-Immunglobulinseren reagieren und welche für die Aktivierung dieser Zellen notwendig sind.

Um eine möglichst reine B-Zellpopulation ohne funktionelle T-Zellen zu bekommen, bietet sich die thymuslose nu/nu Maus an.

1.2.1. Stimulation von nu/nu Milzzellen mit anti-Immunglobulinseren

Abb. 6a zeigt, daß sich die Milzzellen einer nu/nu Maus sehr wohl durch $\alpha\mu$ - Antikörper zur DNA-Synthese stimulieren lassen. Da auch in nu/nu Mäusen eine geringe Anzahl von T-Zellen beschrieben wurde (67), wurden die Milzzellen einer nu/nu Maus mit einem anti-T-Zellantikörper (anti-Thy 1.2-Serum) und Komplement behandelt, um so nun auch die letzten T-Zellen zu entfernen. Wie Abb. 6b zeigt, ließen sich die B-Zellen auch in diesem zusätzlich T-zellverarmten System mit anti-Immunglobulinantikörpern aktivieren. Die weitgehende Abwesenheit von T-Zellen in beiden Versuchen wird auch durch das Ausbleiben einer Aktivierung mit dem T-Zellmitogen Concanavalin A unterstützt. Das B-Zellmitogen LPS ergibt weiterhin gute Stimulationen. Als zweites zeigen diese Versuche, daß die Unterschiede in der Aktivierbarkeit von B-Zellen in Humanserum-haltigem Medium nicht vom Grad der T-Zellverarmung abhängen, also wohl T-zellunabhängig sind.

1.2.2. Die Rolle der adhärenten Zellen bei der anti-Immunglobulinstimulation von Mausmilzzellen

Mittels einer Sephadex G-10 Säule wurden die adhärenten Zellen aus der Zellpopulation einer nu/nu Maus weitgehend eliminiert. Abb. 7 zeigt, daß auch in einem System, das an adhärenten Zellen verarmt ist, B-Zellen durch anti-Immunglobulinseren stimuliert werden, wenn 2-Mercaptoäthanol im Medium vorhanden ist. B-Lymphozyten lassen sich somit durch anti-Immunglobulinantikörper direkt stimulieren. Auch die fördernde Wirkung des Humanserums

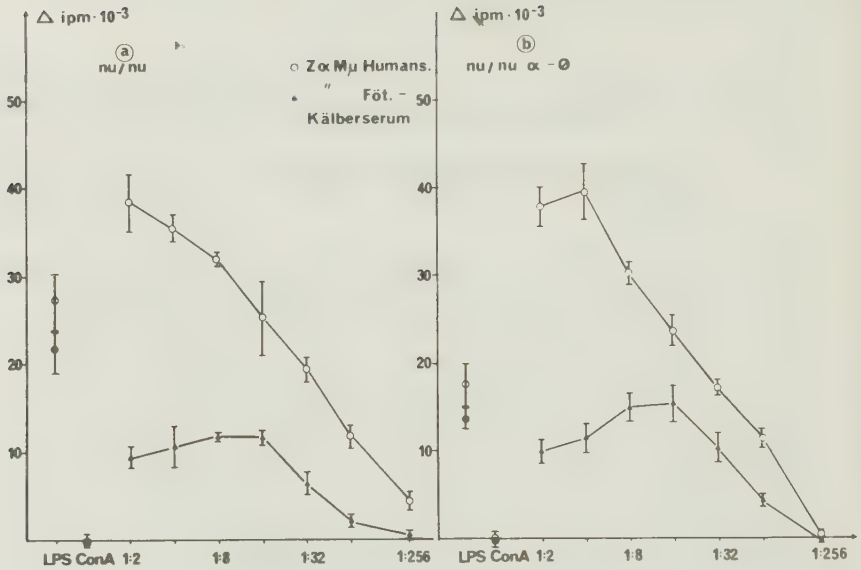

Abb. 6: Stimulation von nu/nu Milzzellen mit anti-Immunglobulinantikörpern

100 µl Balb c nu/nu Milzzellen bzw. nu/nu Milzzellen nach anti-Thy 1.2- und Komplementbehandlung wurden bei einer Zelldichte von $5 \cdot 10^6$/ml kultiviert (2,5 % Humanserum bzw. FKS). Zur Stimulation wurden 50 µl eines ZαMIgM-Antikörpers in der angegebenen Verdünnung gewählt. Con A: 0,5 µg/Kulturansatz LPS: 1 µg/Kulturansatz.

^{3}H-Thymidineinbaubestimmung nach 67 h, Pulsdauer 20 h. Basisstimulation: nu/nu Humanserum: 3382 ± 893, FKS: 2035 ± 195; nu/nu α-Θ: Humanserum 3988 ± 408, FKS 1841 ± 139

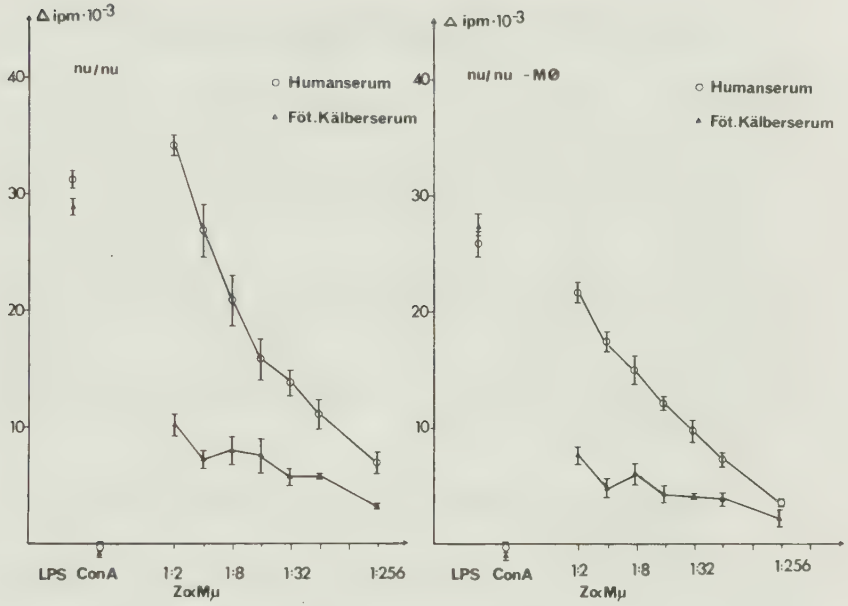

Abb. 7: Stimulation von nu/nu Milzzellen mit anti-Immunglobulinantikörpern nach Entfernung von adhärenten Zellen mittels Sephadex G-10 Filtration

100 µl Balb c nu/nu Milzzellen bzw. nu/nu Milzzellen nach Passage durch Sephadex G-10 - Säulen (äquilibriert mit BSS und dem jeweils nach der Kultur verwendeten Serum) zur Entfernung der adhärenten Zellen wurden bei einer Zelldichte von $5 \cdot 10^6$/ml kultiviert (2,5 % Humanserum bzw. FKS). Als Stimulans 50 µl ZαMIgM-Antikörper in der angegebenen Verdünnung; LPS: 1 µg/Kulturansatz ConA 0,5 µg/Kulturansatz.
Basisstimulation: nu/nu Humanserum: 2336 ± 119, FKS 2253 ± 72; nu/nu-MØ Humanserum: 1986 ± 129, FKS 2894 ± 178 ipm

scheint auf der B-Zellebene zu wirken, da sie unabhängig vom Vorhandensein von T-Zellen und auch nach weitgehender Eliminierung von adhärenten Zellen offenbar ist.

1.3. Autoradiographische Studien zur Aktivierung von Mausmilzzellen mit anti-Immunglobulinseren

Man könnte einwenden, daß durch anti-Immunglobulinantikörper nicht mehr Zellen zur DNA-Synthese aktiviert werden, sondern die Zellen nur länger überleben können und damit sozusagen die Hintergrundstimulation steigt. Obwohl die Kinetik (siehe IV, 1.1.4., S. 26) der Reaktion gegen diese Annahme spricht, wurde untersucht, ob die Stimulierung des ^{3}H-Thymidineinbaues auch gleichermaßen mit einer Vermehrung der Zellen, die zur DNS-Synthese aktiviert werden, einhergeht. Außerdem sollte der Anteil der reagierenden B-Zellen bestimmt werden, wozu nun autoradiographische Studien herangezogen wurden.

1.3.1. Einbau von ^{14}C-Thymidin in B-Lymphozyten einer nu/nu Maus

nu/nu Milzzellen wurden mit anti-Thy 1.2 und Komplement behandelt. Die Zellen wurden dann mit ZαMμ - Antikörpern in Gegenwart von Humanserum bzw. FKS kultiviert. Nach 50 Stunden Kulturdauer wurden die Zellen für 10 Stunden mit ^{14}C-Thymidin gepulst. Bei einem Teil der Zellen wurde danach der ^{14}C-Thymidineinbau gemessen, der andere Teil wurde für die Autoradiographie aufbereitet.

Abb. 8 zeigt, daß sich im Humanserum, entsprechend dem erhöhten Thymidineinbau, bis zu 60 % der B-Lymphozyten durch ZαMμ - Antikörper zur DNA-Synthese aktivieren lassen, was sicherlich nicht mit einem präferentiellen Überleben von Zellen vereinbar ist.

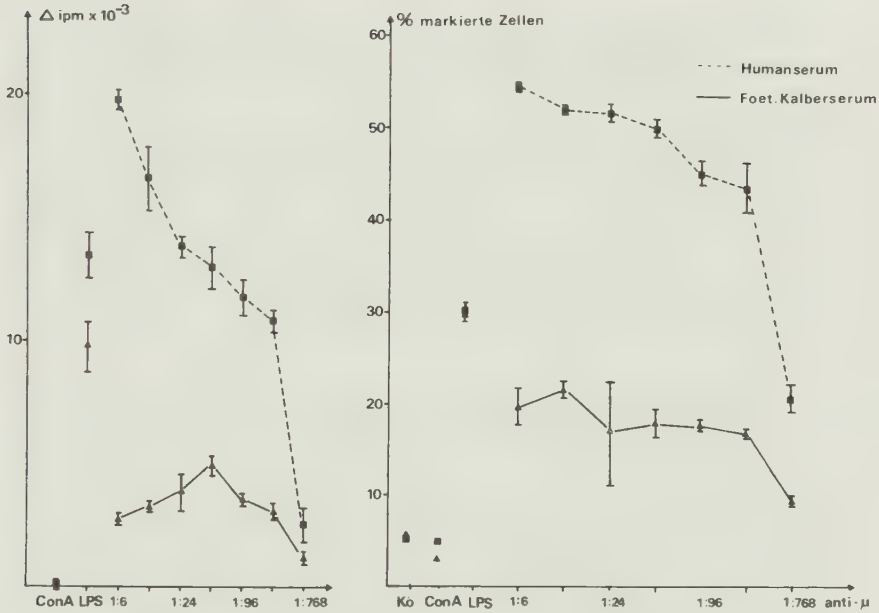

Abb. 8: Autoradiographie von anti-Thy 1.2- und Komplement-behandelten nu/nu Milzzellen nach Stimulation mit anti-Immunglobulinantikörpern

100 µl nu/nu Milzzellen nach anti-Thy 1.2- und Komplementbehandlung ($5 \cdot 10^6$/ml, 2,5 % Humanserum bzw. FKS). Als Stimulans wurden 50 µl eines Z×MIgM-Antikörpers in der angegebenen Verdünnung gewählt. LPS: 1 µg/Kulturansatz ConA: 0,5 µg/Kulturansatz. Nach einer Kulturdauer von 50 h Zugabe von 25 µl ^{14}C-Thymidin (7 µCi/ml). Nach weiteren 10 h wurde bei einem Teil der Zellen der ^{14}C-Thymidineinbau bestimmt. Die anderen Zellen wurden zur Autoradiographie aufgearbeitet.
Basisstimulation: Humanserum: 1231 ± 151/3,75 %, FKS: 1109 ± 385/2,25 %

2. ROLLE DES Fc-REZEPTORS BEI DER AKTIVIERUNG VON MAUS-B-LYMPHOZYTEN DURCH ANTI-IMMUNGLOBULINSEREN

Als zweiter wichtiger Unterschied zwischen den bisher beschriebenen Experimenten und den negativen Resultaten in der Literatur fällt die Verwendung von anti-Immunglobulinseren verschiedener Spezies auf. Die obigen Versuche waren alle mit anti-Maus-Ig Seren, die aus der Ziege gewonnen waren, durchgeführt worden, während in der Literatur vorwiegend Kaninchenantiseren verwendet wurden.

2.1. Stimulation von Mausmilzzellen mit ZαMμ - und KαMμ - Seren

Maus Milzzellen wurden entweder mit ZαMμ - Antikörpern (Ziege) oder mit einem KαMμ - Antikörper (Kaninchen) sowohl in Gegenwart von Humanserum als auch in Gegenwart von FKS kultiviert. Nach 67 Stunden wurde wieder der ^{3}H-Thymidineinbau nach einer Pulszeit von 19 Stunden bestimmt. Abb. 9 zeigt, daß anti-Immunglobulinseren, die in der Ziege hergestellt wurden, eine wesentlich bessere Aktivierungspotenz besitzen als anti-Immunglobulinseren vom Kaninchen. Dieser Effekt zeigt sich vor allem bei Kultur in Medium, das mit Humanserum zubereitet wurde.

Besonders die letzten Experimente lenkten das Augenmerk auf den Fc-Teil des zur Stimulation verwendeten Antikörpers. Schon vor längerer Zeit schlug Sinclair (19) ein Modell vor, in dem ein Antikörper durch Koppelung von Fc-Rezeptor und Immunglobulinrezeptor einer B-Zelle eine negative Rückkoppelung bewirkt. Die Koppelung käme auf die Weise zustande, daß der Antikörper mit seiner Antigenbindungsstelle mit dem Immunglobulinrezeptor und sein Fc-Teil gleichzeitig mit dem Fc-Rezeptor interagiert. Durch dieses Modell könnten die Unterschiede in den hier und in den in der Literatur beschriebenen Experimenten leicht erklärt werden. Beide Änderungen im Versuchsprotokoll würden nämlich

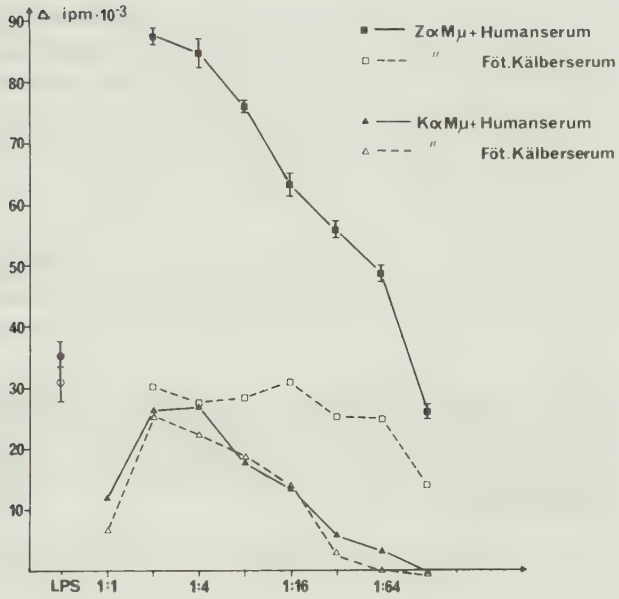

Abb. 9: Stimulation von Maus Milzzellen mit ZαMIgM- bzw. KαMIgM-Antikörpern

100 µl Balb c Milzzellen ($5 \cdot 10^6$/ml, 2,5 % Humanserum, FKS) kultiviert. Als Stimulans wurden 50 µl KαMIgM- bzw. ZαMIgM-Antiserum in der jeweils angegebenen Verdünnung zugegeben. LPS: 1 µg/Kultur.
Nach 67 h wurde der ^{3}H-Thymidineinbau bei einer Pulszeit von 19 h bestimmt.
Basisstimulation: Humanserum 3272 ± 1105, FKS 3686 ± 263 ipm

eine Interaktion des Fc-Teiles mit dem Fc-Rezeptor schwächen und somit auch eine negative Rückkoppelung: Erstens ist es bekannt, daß aggregiertes IgG im Humanserum in größeren Mengen vorhanden ist als im FKS, das praktisch frei von Immunglobulin ist. Dieses aggregierte humane IgG könnte nun den Fc-Rezeptor besetzen und so die Interaktion

zwischen Fc-Rezeptor und Fc-Teil des stimulierenden Antikörpers schwächen. Zweitens wurde von Alexander und Sanders (18) beschrieben, daß Antikörper von der Ziege eine geringere Affinität zum humanen Fc-Rezeptor haben als Kaninchenantikörper. Kaninchenantikörper würden so also ein starkes negatives Signal geben, wodurch die geringere stimulierende Fähigkeit zu erklären wäre.

Ausgehend von solchen Überlegungen wurden die folgenden Experimente geplant, um die Arbeitshypothese zu erhärten. Siehe zum folgenden auch das Modell Seite 70 (Abb. 21).

2.2. Änderung der stimulierenden Aktivität von Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulinseren durch enzymatische Abspaltung des Fc-Teiles und Dissoziation in monovalente Antikörperfragmente

Als naheliegendster Versuch wurde von einem Kaninchen-anti-Maus-kappa-Antikörper, der als intaktes IgG Molekül Maus B-Zellen nicht zur Proliferation aktivieren kann, der Fc-Teil mit Pepsin enzymatisch abgespalten. Das unter anderem entstehende bivalente $F(ab')_2$-Bruchstück wurde über Molekularsieb- und anschließende Affinitätschromatographie an einer Protein A - Sepharosesäule gereinigt. Es wurden nur die Fraktionen verwandt, die im SDS-Gel sowohl unter reduzierenden wie auch nicht reduzierenden Bedingungen keine Verunreinigungen, insbesondere teilweise oder ungespaltene schwere Ketten, enthielten. Zusätzlich wurde ein Teil der bivalenten Kaninchen $F(ab')_2$-anti-Maus-kappa - Fragmente unter schonenden reduzierenden Bedingungen in monovalente F(ab')-Fragmente übergeführt. Diese wurden durch Alkylierung der entstandenen Sulfhydrilgruppen stabilisiert. Anschließend wurde noch eine Reinigung durch Molekularsiebchromatographie durchgeführt.

Diese drei verschiedenen Formen eines Antikörpers, bei denen die Antigenbindungsstelle nicht verändert worden war, wurden

nun auf ihre Fähigkeit zur Aktivierung von Maus Milzzellen zur DNA-Synthese untersucht. Abb. 10 zeigt zwei wesentliche Voraussetzungen für die Aktivierung von Maus B-Lymphozyten zur Proliferation. Erstens muß der zur Aktivierung benutzte Antikörper mindestens bivalent sein, da monovalente F(ab')-

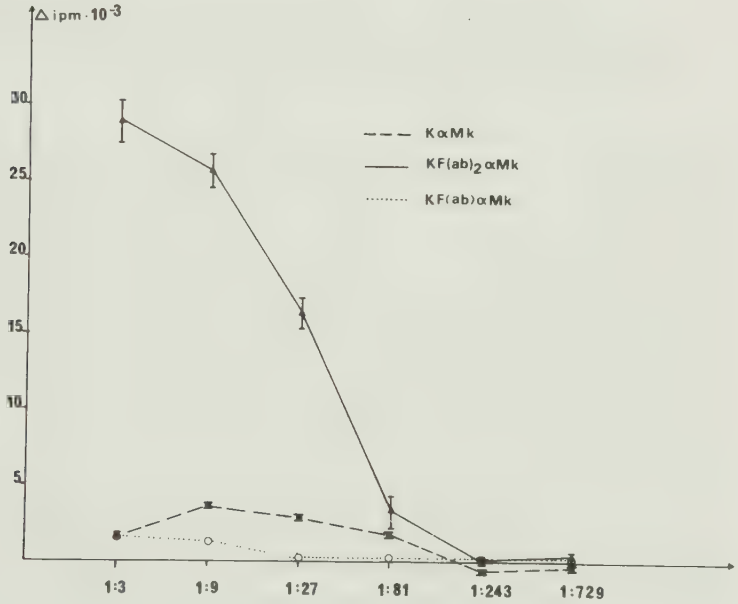

Abb. 10: Änderung der stimulierenden Aktivität von KαMκ-Antikörpern durch enzymatische Abspaltung des Fc-Teiles und Dissoziation in monovalente Antikörperfragmente

100 µl Balb c Milzzellen ($2{,}5 \cdot 10^6$/ml, 2,5 % Humanserum), kultiviert mit 50 µl der angegebenen Verdünnungen von KαMκ, KF(ab')$_2$αMκ, bzw. KF(ab')αMκ - Antikörpern. 68 h Kulturdauer, ^{3}H-Thymidin Pulszeit 20 h.
Basisstimulation: 1290 ± 300 ipm

Fragmente nicht stimulierend wirken. Es muß also eine Vernetzung von Oberflächenimmunglobulin stattfinden. Zweitens bestätigt sich das Erwartete. Der ungespaltene Antikörper kann die Zellen nicht aktivieren. Nach Entfernung des Fc-Teiles besitzt das dann entstandene $F(ab')_2$-Fragment eine hohe stimulierende Fähigkeit.

2.3. Komplexierung des Fc-Teiles von Kaninchen-anti-Maus-kappa-Antikörpern mit Protein A und dessen Einfluß auf die Aktivierung von Maus Milzzellen

Protein A ist ein Protein, das aus der Zellwand von Staphylokokkus aureus isoliert wurde (47). Es ist bekannt, daß Protein A spezifisch, ohne Wechselwirkung mit der Antigenbindungsstelle, den Fc-Teil von vielen IgG-Molekülen bindet (48). Entsprechend der obigen Arbeitshypothese könnte man so den Fc-Teil des nicht stimulierenden Kaninchen-anti-Maus-kappa-Antikörpers mit Protein A komplexieren, eine Interaktion von Fc-Teil und Fc-Rezeptor verhindern, wonach die B-Zellen aktiviert werden müßten. Es wurden also Maus Milzzellen mit Kaninchen-anti-Maus-kappa - Serum kultiviert und steigende Mengen Protein A zugegeben. Nach 68 Stunden wurde der ^3H-Thymidineinbau gemessen. Aus Abb. 11a ersieht man, daß 2,5 µg Protein A durch Komplexierung der Fc-Teile der Kaninchen-anti-Maus-kappa-Antikörper den hemmenden Einfluß des Fc-Teiles völlig aufheben und so der durch die Interaktion mit dem Ig-Rezeptor hervorgerufene positive Effekt, die Aktivierung zur Proliferation, zum Tragen kommt. Protein A alleine besitzt keine mitogenen Eigenschaften unter diesen Bedingungen. Außerdem beeinflußt es die Aktivität des $F(ab')_2$-Stückes, das keinen Fc-Teil mehr besitzt, nicht (Abb. 11b).

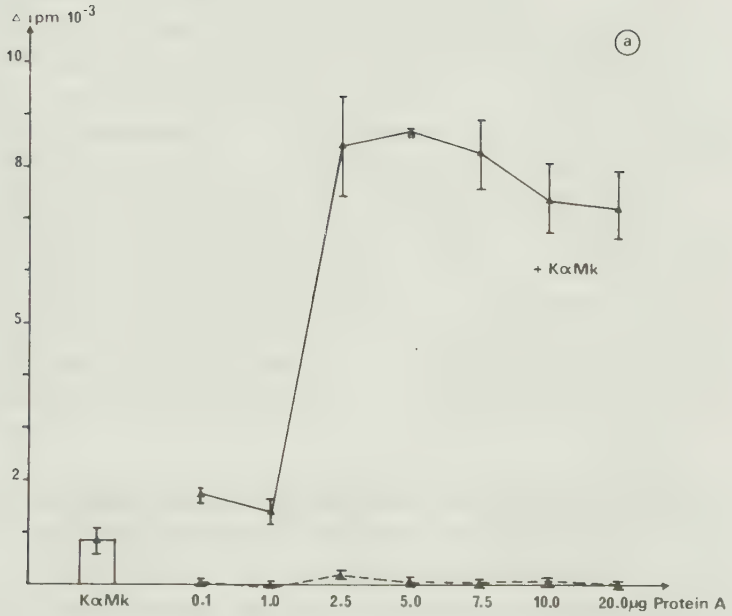

Abb. 11a: Komplexierung des Fc-Teiles von KαMκ-Antikörpern an Protein A und sein Einfluß auf die Aktivierung von Maus Milzzellen

100 µl Balb c Milzzellen ($2{,}5 \cdot 10^6$/ml, 2,5 % Humanserum), kultiviert mit 25 µl KαMκ - Antiserum, 1 : 2 verdünnt. Dazu wurden steigende Mengen Protein A gegeben. In Parallelansätzen wurden die Zellen nur mit Protein A bzw. KαMκ - Antikörpern kultiviert. Nach 68 h wurde der ^{3}H-Thymidineinbau nach einer Pulszeit von 21 h bestimmt.
Basisstimulation: 344 ± 18 ipm

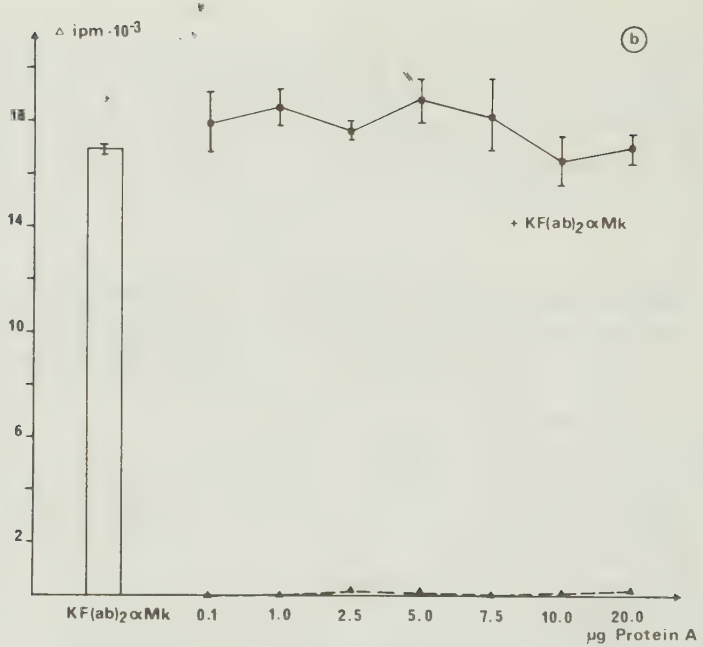

Abb. 11b: Einfluß von Protein A auf die Stimulation durch KαF(ab')$_2$ αMχ - Antikörpern
Entsprechend Fig. 11a wurde das gleiche Experiment mit K F(ab')$_2$ αMχ - Antikörpern 1 : 2 verdünnt durchgeführt.
Basisstimulation: 344 $\pm$ 18 ipm

2.4. Einfluß von intaktem Kaninchen-anti-Maus-kappa-Antikörper auf die Stimulation von Mausmilzzellen durch Ziegen-F(ab')$_2$-anti-Maus μ-Antikörper bzw. Kaninchen-F(ab')$_2$-anti-Maus-kappa - Antikörper

Um die Dominanz des negativen Signals, das über den Fc-Rezeptor gegeben wird, noch deutlicher zu zeigen, wurden zu Mausmilzzellen Ziege F(ab')$_2$-anti-Maus μ- bzw. Kaninchen F(ab')$_2$-anti-Maus-kappa-Antikörper, die zu einer guten Stimulation des ^{3}H-Thymidineinbaues führten, gegeben.

Gleichzeitig wurden steigende Mengen von intaktem Kaninchen-anti-Maus-kappa-Antikörper zugegeben. Abb. 12 a+b zeigt, daß intaktes Kaninchen-anti-Maus-kappa-Antiserum das stimulierende Ziege-$F(ab')_2$-anti-Maus-IgM-Antiserum voll antagonisieren kann. Ebenso ist bei einem Mischungsverhältnis von 1 : 1 die aktivierende Fähigkeit von Kaninchen-$F(ab')_2$-anti-Maus-kappa-Antikörpern vollständig durch intakten Kaninchen-anti-Maus-kappa-Antikörper gehemmt. Mischt man den Ziege-$F(ab')_2$-anti-Maus-IgM-Antikörper mit dem Kaninchen-$F(ab')_2$-anti-Maus-kappa-Antikörper, ergibt sich keine Hemmung, sondern eher eine additive stimulierende Wirkung. Die vorher beschriebene Wirkung ist demnach nicht auf eine Kreuzreaktion zwischen dem Ziege-anti-Maus-IgM und dem Kaninchen-anti-Maus-kappa-Antiserum zurückzuführen.

2.5. Nachweis des negativen Signals, vermittelt durch den Fc-Rezeptor, mit Hilfe eines Antikörpers, der gegen den stimulierenden Antikörper gerichtet ist

In den oben beschriebenen Versuchen zeigte sich, daß durch Vernetzung von Oberflächenimmunglobulin auf der Zelloberfläche durch anti-Immunglobulinseren Maus B-Lymphozyten zur Proliferation aktiviert werden können. Bei gleichzeitiger Interaktion des anti-Immunglobulin Antikörpers über seinen Fc-Teil mit dem Fc-Rezeptor der Zelle bedeutet dies jedoch für die Zelle ein Stopsignal. Es gab nun zwei Möglichkeiten, dies zu erklären:

1) Der Fc-Rezeptor vermittelt ein dominantes negatives Signal, wenn eine Koppelung von Immunglobulinrezeptor und Fc-Rezeptor über den anti-Ig-Antikörper stattfindet.
2) Wenn der Fc-Teil des Antikörpers an den Fc-Rezeptor bindet, induziert dies eine Konformationsänderung an der Antigenbindungsstelle des Antikörpers in der Weise, daß dadurch die Interaktion mit dem Immunglobulinrezeptor der Zelle nicht zu einem Aktivierungssignal führt.

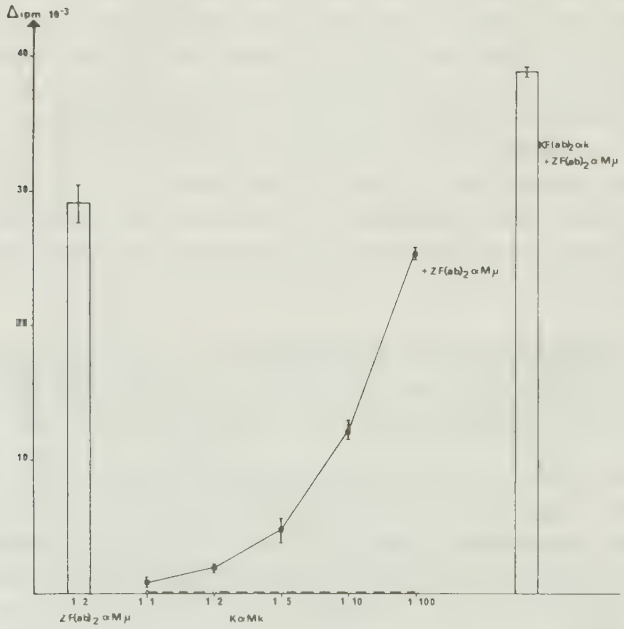

Abb. 12a: Einfluß von KαMκ - Antikörper auf die Stimulation von Mausmilzzellen durch Z $F(ab')_2 \propto$ MIgM-Antikörper

100 µl Balb c Milzzellen ($2{,}5 \cdot 10^6$/ml, 2,5 % Humanserum), kultiviert bei konstantem Zusatz von 25 µl Z $F(ab')_2 \propto$ MIgM-Antiserum, 1 : 2 verdünnt, und 25 µl KαMκ - Antiserum der angegebenen Verdünnungen. In Parallelansätzen wurde den Zellen nur 25 µl Z $F(ab')_2 \propto$ MIgM 1 : 2 bzw. 25 µl Z $F(ab')_2 \propto$ IgM 1 : 2 und K $F(ab')_2 \propto$ Mκ 1 : 2 zugesetzt. Nach 68 h ^{3}H-Thymidineinbaubestimmung; Pulszeit 19 h.
Basisstimulation: 740 ± 118 ipm

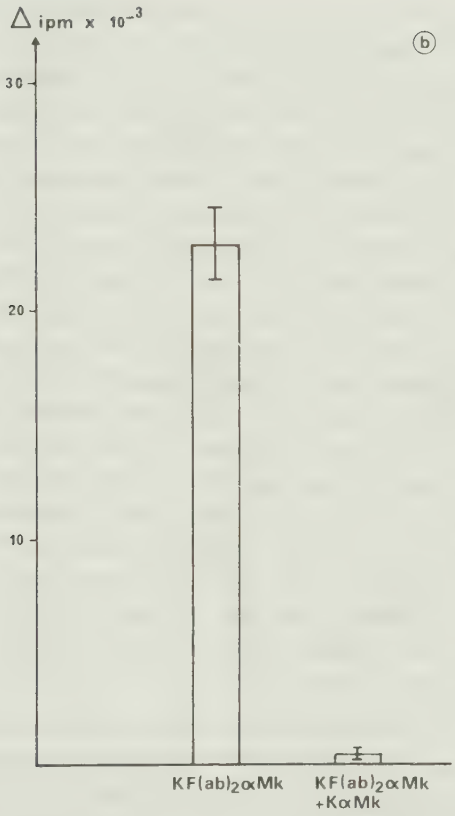

Abb. 12b: Einfluß von KαMX - Antikörpern auf die Stimulation von Mausmilzzellen durch K $F(ab')_2\alpha$ - MX - Antikörpern

Das Experiment wurde entsprechend Abb. 12a durchgeführt.
K $F(ab')_2\alpha$ MX : 25 µl/Kultur 1 : 2 verdünnt
KαMX : 25 µl/Kultur 1 : 2 verdünnt
Basisstimulation: 740 ± 118 ipm

Im ersten Fall wäre es nicht zwingend notwendig, daß Antigenbindungsstelle (positives Signal) und Fc-Teil (negatives Signal) auf dem gleichen Molekül sitzen, solange nur Fc-Rezeptor und Ig-Rezeptor anderweitig vernetzt werden. Es wurden deshalb Maus Milzzellen mit einer gut stimulierenden Menge von Ziege $F(ab')_2$-anti-Maus-IgM-Serum kultiviert. Der Kultur wurden dann in steigenden Mengen intakte Kaninchen-anti-Ziege 7S-Immunglobuline bzw. die $F(ab')_2$-Präparation davon zugegeben. Abb. 13a zeigt, daß eine Hemmung der Aktivierung durch das Ziege $F(ab')_2$-anti-Maus-IgM-Serum auch dann erreichbar ist, wenn der Antikörper, der mit dem Fc-Rezeptor reagieren kann, nicht gleichzeitig auch gegen den Immunglobulinrezeptor auf dem B-Lymphozyten gerichtet ist, sondern wenn er durch Bindung an den stimulierenden Antikörper via Antigenbindungsstelle und Interaktion mit dem Fc-Rezeptor durch sein Fc-Ende einen "Brückenschlag" zwischen Immunglobulinrezeptor und Fc-Rezeptor sicherstellt. Entfernt man von diesem zweiten Antikörper den Fc-Teil, bleibt auch die Hemmung aus. Der Versuch eines "sandwich" zeigt deutlich die direkte Rolle des Fc-Rezeptors bei der Gabe eines negativen Signals.

Verwendet man in einem entsprechenden Versuch als stimulierenden Antikörper Kaninchen $F(ab')_2$-anti-Maus-kappa-Antikörper und gibt dazu Kaninchen-anti-Ziege 7S bzw. die dazu gehörige $F(ab')_2$-Präparation, ist keine Hemmung der Stimulation zu erkennen (Abb. 13b). In diesem Fall ist die Antigenbindungsstelle des zweiten Antikörpers nicht gegen den stimulierenden ersten Antikörper gerichtet; es resultiert keine Hemmung. Diese ist also nicht auf eine etwaige Kreuzreaktion des Kaninchen-anti-Ziege-7S-Immunglobulins mit Strukturen auf der Maus B-Lymphozytenoberfläche zurückzuführen.

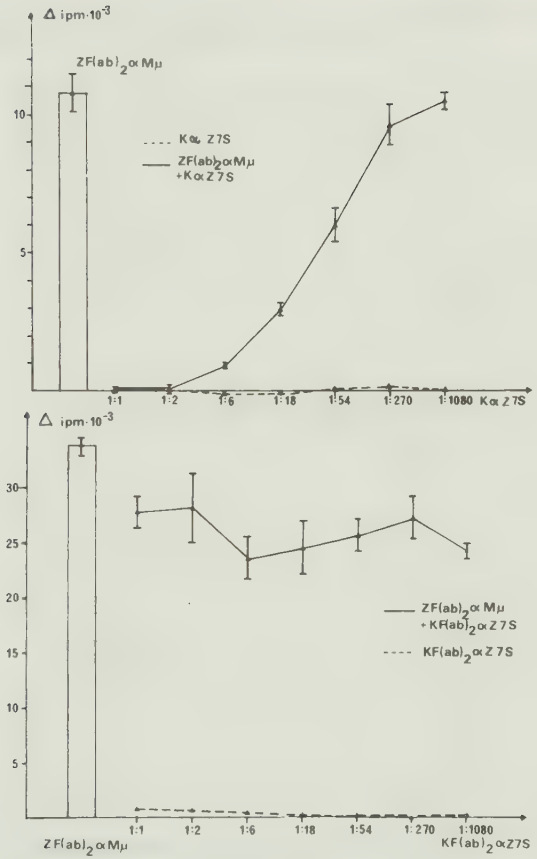

Abb. 13a: Demonstration des negativen Signals, vermittelt durch den Fc-Rezeptor, mit Hilfe eines Antikörpers, der gegen den stimulierenden Antikörper gerichtet ist

100 µl Balb c Milzzellen ($2{,}5 \cdot 10^6$/ml, 2,5 % Humanserum), mit $ZF(ab')_2 \propto M\mu$, $K\propto Z7S$, $KF(ab')_2\propto$-Z7S - Antiseren einzeln und in Mischung kultiviert.

$ZF(ab')_2\propto M\mu$: 25 µl einer 1 : 25 Verdünnung/Kultur
$K\propto Z7S$: 25 µl der angezeigten Verdünnung/Kultur
$KF(ab')_2\propto 7S$: 25 µl der angezeigten Verdünnung/Kultur

Nach 68 h wurde bei einer Pulszeit von 20 h der 3H-Thymidineinbau bestimmt.
Basisstimulation: 253 ± 15 ipm

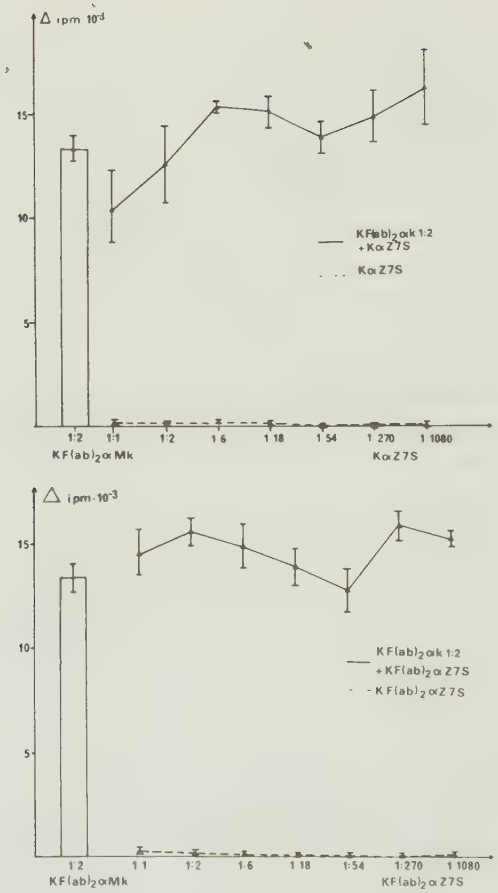

Abb. 13b: Spezifität der durch KαZ 7 S - Antikörper hervorgerufenen Hemmung der Aktivierung von Mausmilzzellen durch anti-Immunglobulinantikörper

Das Experiment wurde entsprechend Abb. 13a durchgeführt.
$KF(ab')_2\alpha MK$: 25 µl einer 1 : 2 Verdünnung/Kultur
KαZ 7 S : 25 µl der angegebenen Verdünnung/Kultur
$KF(ab')_2\alpha Z\,7\,S$: 25 µl der angegebenen Verdünnung/Kultur
Basisstimulation: 253 ± 15 ipm

2.6. Nachweis des negativen Signals über den Fc-Rezeptor bei Ziegen-anti-Immunglobulinseren

Wie oben gezeigt, gelang mit anti-Immunglobulinseren, die von der Ziege gewonnen waren, im Gegensatz zu Kaninchenantiseren, auch mit intaktem Antikörper eine Aktivierung von Maus B-Zellen zur Proliferation.

Alexander und Sanders (18) zeigten, daß der Fc-Teil von Ziegenantikörpern eine geringere Affinität zum Fc-Rezeptor von menschlichen B-Lymphozyten besitzt als der Fc-Teil von Kaninchenantikörpern. Falls ähnliche Affinitätsunterschiede zwischen den Fc-Teilen von Kaninchen- bzw. Ziegeantikörpern und den Fc-Rezeptoren von Maus B-Zellen bestünden, könnte dies die in IV., 2.1. (Seite 34) beschriebenen Befunde erklären. Kaninchen-anti-Immunglobulinseren würden durch ihre höhere Affinität zum Fc-Rezeptor der Zelle eher zu einem negativen Signal führen als Ziegenantiseren. In der Tat lassen sich mit intaktem Ziegen-anti-Immunglobulin signifikante Stimulationen erreichen; intakte Kaninchen-anti-Immunglobulinseren bewirken dagegen keine Stimulation. Erst eine Unterbindung der Wechselwirkung von Fc-Teil des Antikörpers mit dem Fc-Rezeptor der Zelle deckt die potentiell stimulierende Wirkung des Kaninchenantikörpers auf (Abb. 9 - 13).

Um nun zu zeigen, daß auch bei Ziegen-anti-Immunglobulinseren ein negatives Signal durch den Fc-Teil des Antikörpers vermittelt wird, wurde ein Ziege-anti-Maus-μ -Antiserum und das daraus hergestellte $F(ab')_2$-Fragment auf gleiche Antigenbindungskapazität, entsprechend gleicher Aktivierungsfähigkeit, eingestellt. Eine unterschiedliche Stimulationsfähigkeit wäre so dem Einfluß des Fc-Teiles zuzuschreiben.

Als erstes wurde das Ziege-anti-Maus-IgM-Serum an AH-Sepharose 4B durch Glutaraldehydaktivierung gekoppelt. Mit Hilfe dieses Immunosorbens wurde aus gepooltem Mausserum immunelektrophoretisch reines IgM gewonnen. Anschließend wurde ein Teil des so gewonnenen Maus-IgM mit Hilfe der Chloramin T - Methode jodiert. In einem "solid phase RIA" wurden nun

intaktes Ziege-anti-Maus-IgM - Serum und das zugehörige $F(ab')_2$-Fragment auf ihre Antigenbindungskapazität geprüft. Aus dem Ergebnis wurden die Titerunterschiede berechnet. Anschließend wurden Maus Milzzellen sowohl mit dem ungespaltenen Ziege-anti-Maus-μ-Immunglobulin als auch mit dem entsprechend der Antigenbindungskapazität verdünnten $F(ab')_2$-Fragment versetzt. Nach 30, 47, 68 und 92 Stunden wurde dann

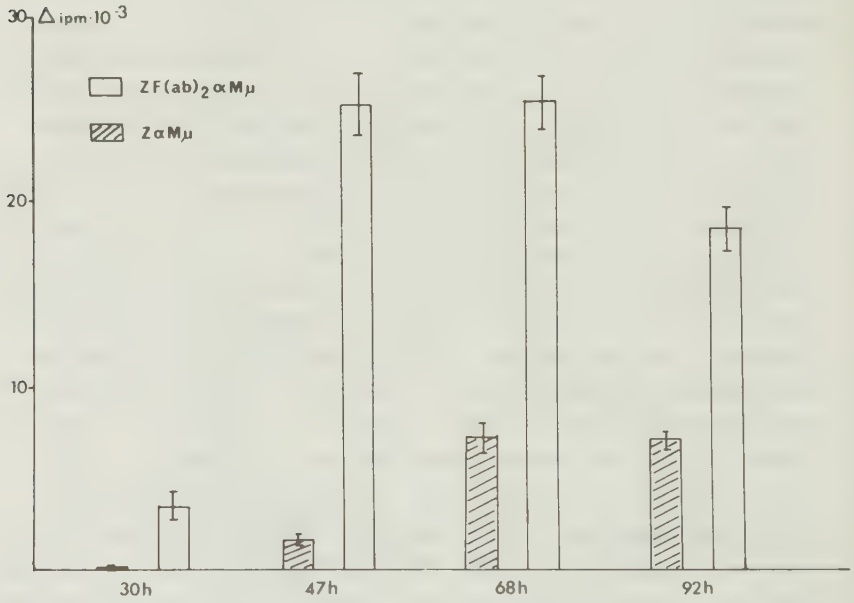

Abb. 14: Demonstration des negativen Signals über dem Fc-Rezeptor bei Ziegen-anti-Immunglobulinseren
100 µl Balb c Milzzellen ($2{,}5 \cdot 10^6$/ml, 2,5 % Humanserum), mit 25 µl ZxMIgM-Antikörpern und 25 µl von dem daraus hergestellten $F(ab')_2$-Fragment kultiviert. Beide Antiserumpräparationen wurden mit Hilfe eines RIA auf die gleiche Antigenbindungskapazität eingestellt. In Parallelkulturen wurde nach 30, 47, 68 und 92 h bei einer konstanten Pulsdauer von 20 h der ^{3}H-Thymidineinbau bestimmt.
Basisstimulation (ipm): 30 h: 651 ± 89; 47 h: 286 ± 71; 68 h: 673 ± 89; 92 h: 551 ± 99

die ^{3}H-Thymidineinbaurate bestimmt. Abb. 14 zeigt, daß das $F(ab')_2$-Fragment des Ziegenantikörpers ein wesentlich höheres Aktivierungspotential im Vergleich zum intakten Antikörper besitzt. Dieser Unterschied ist in der Kinetik zu allen untersuchten Zeiten gleichermaßen vorhanden. Das durch den Fc-Rezeptor vermittelte negative Signal ist also auch hier deutlich darstellbar.

Aus der gleichförmigen Bindungskurve im solid phase RIA zeigt dieses Experiment, daß der intakte Antikörper und das daraus präparierte $F(ab')_2$-Bruchstück die gleiche Bindungscharakteristik haben (Daten nicht gezeigt). Somit ist der Effekt nicht durch eine Änderung der Bindungsstelle bei der enzymatischen Spaltung bedingt.

3. ROLLE DES IgD-REZEPTORS BEI DER AKTIVIERUNG VON MAUS B-LYMPHOZYTEN

Während ich die obigen Experimente durchführte, wurden auch in anderen Laboratorien unabhängig davon Kulturbedingungen ausgearbeitet, in denen eine Stimulation von Maus B-Lymphozyten mit anti-IgM, anti-$F(ab')_2$- oder anti-kappa-Antikörpern gelang, wenn auch die Rolle und Bedeutung des Fc-Rezeptors in diesen Experimenten unerkannt blieb (62, 63). In diesen Arbeiten wurde auch gezeigt, daß mit den dort verwendeten anti-Maus-IgD - Antikörpern keine Aktivierung zur Proliferation zu erreichen ist.

3.1. Stimulation von Maus Milzzellen mit anti-Maus-IgD - Antikörpern

Aufbauend auf den Experimenten zur Rolle des Fc-Rezeptors wurde ein monoklonaler, allotypischer Maus-anti-Maus-IgD - Antikörper verwandt, der selbst der IgM-Klasse angehört (8). Damit ist ein negatives Signal über Fc-Rezeptoren nicht zu erwarten, da Fc-Rezeptoren für IgM auf Maus B-Zel-

len nicht beschrieben wurden. Milzzellen von C 57 Bl 6 Mäusen wurden mit anti-Maus-IgD - Serum in Gegenwart von Humanserum kultiviert, nach verschiedenen Zeiten wurde der ^{3}H-Thymidineinbau bestimmt. Die Pulsdauer betrug jeweils 18 Stunden.

Wie Abb. 15 zeigt, lassen sich Maus Milzzellen durch die hier verwendeten anti-IgD - Antikörper zur Proliferation

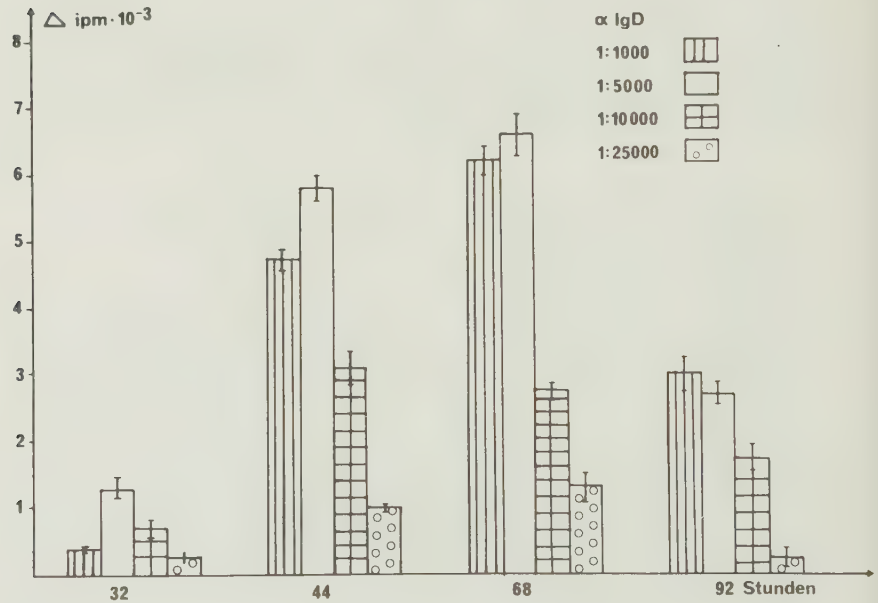

Abb. 15: Stimulation von Maus Milzzellen mit anti-Maus-IgD - Antikörpern

100 µl C 57 Bl 6 Milzzellen ($5 \cdot 10^{6}$/ml, 2,5 % Humanserum), mit 25 µl unterschiedlicher Verdünnungen eines monoklonalen αIgD-Serums kultiviert. Nach 32, 44, 68 und 92 h wurde bei konstanter Pulszeit von 18 h der ^{3}H-Thymidineinbau bestimmt.
Basisstimulation (ipm): 32 h: 689 ± 107; 44 h: 730 ± 252; 68 h: 926 ± 266; 92 h: 977 ± 161

aktivieren. Das Optimum der Stimulation ergibt sich bei Zugabe von 25 µl einer 1 : 5000 Verdünnung des monoklonalen anti-IgD-Antikörpers auf $5 \cdot 10^5$ Milzzellen in 100 µl Medium. Die kinetische Untersuchung ergab ein Optimum bei einer Kulturdauer von 68 Stunden. Die Stimulierbarkeit des ^{3}H-Thymidineinbaues ist jedoch bei anti-IgD - Antiserum deutlich schwächer als mit anti-IgM- bzw. anti-kappa-Antikörpern.

3.2. Spezifität der Stimulation von Maus Milzzellen durch anti-IgD-Antikörper

Um zu zeigen, daß die Stimulation über den IgD-Rezeptor hervorgerufen wird, wurde die Spezifität der Stimulation bestimmt. Dazu wurden Maus Milzzellen mit Ziege-F(ab')$_2$-anti-Maus-µ, Kaninchen-F(ab')$_2$-anti-Maus-kappa- bzw. Maus-anti-Maus-IgD-Antikörpern kultiviert. Gleichzeitig wurden zur Kultur MOPC 104 E (μ, λ) bzw. MOPC 21 ($\gamma, \varkappa$) Immunglobuline zugegeben. Die Stimulation durch Ziege-F(ab')$_2$-anti-Maus-µ - Antikörper wird nur durch das IgM Myelomprotein, die Stimulation durch Kaninchen - F(ab')$_2$-anti-Maus-kappa - Antikörper nur durch ein die kappa-Kette tragendes Immunglobulin, die Stimulation durch anti-IgD durch keines der zugegebenen Immunglobuline gehemmt (Tab. 1a). Da das anti-IgD - Serum eine Allospezifität für den Haplotyp Ig^b besitzt, wurden sowohl C 57 Bl 6(Ig^b) als auch Balb c (Ig^a) Milzzellen mit anti-IgD - Antikörpern kultiviert. Tab. 1b zeigt, daß mit dem anti-Maus-IgD - Serum nur die C 57 Bl 6 (Ig^b)-Milzzellen stimuliert werden können, während die anti-IgM-, bzw. anti-kappa-Präparationen sowohl C 57 Bl 6 (Ig^b) als auch Balb c (Ig^a) Milzzellen stimulieren. Die stimulierende Wirkung des anti-IgD - Serums beruht also nicht auf einer eventuellen Kreuzreaktion mit der µ- oder kappa-Kette.

Als nächstes sollte mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten anti-IgD - Antikörpers die Anzahl der IgD-positiven Zellen

Tab. 1a: Spezifität der Stimulation von Maus Milzzellen durch anti-IgD - Antikörper

100 µl C57 Bl 6 Milzzellen ($2{,}5 \cdot 10^6$/ml, 2,5 % Humanserum), mit $ZF(ab')_2 \alpha IgM$-, $KF(ab')_2 \alpha \varkappa$-, bzw. anti-IgD - Antikörpern kultiviert. Den Kulturen wurden 12,5 µg MOPC 104 E (μ, λ) bzw. 2 µg MOPC ($\gamma, \varkappa$) zugesetzt.
$ZF(ab')_2 \alpha IgM$: 25 µl 1 : 3 verdünnt/Kultur
$KF(ab')_2 \alpha \varkappa$: 25 µl 1 : 3 verdünnt/Kultur
anti-IgD : 25 µl 1 : 5000 verdünnt/Kultur

aktiv. Antikörper	Myelomprotein	Hemmung
$ZF(ab')_2 \alpha M\mu$	MOPC 104 E (μ, λ)	100 %
anti-IgD	MOPC 104 E	0 %
$KF(ab')_2 \alpha M\varkappa$	MOPC 21 ($\gamma, \varkappa$)	100 %
anti-IgD	MOPC 21	0 %

Tab. 1b: Allo-Spezifität des anti-IgD - Antikörpers

Milzzellen wurden entsprechend Tab. 1a mit $ZF(ab')_2 \alpha IgM$, $KF(ab')_2 \alpha \varkappa$ - bzw. anti-IgD-Antikörpern kultiviert. Die Milzzellen waren dabei bei der Hälfte der Ansätze aus Balb c Mäusen (Ig^a), bei der anderen Hälfte von C57 Bl 6 Mäusen (Ig^b) gewonnen.

	C57 Bl 6 (Ig^b)	Balb c (Ig^a)
Kontrolle	895 ipm	712 ipm
$ZF(ab')_2 \alpha M\mu$	31650 ipm	21476 ipm
$KF(ab')_2 \alpha M\varkappa$	11315 ipm	18331 ipm
anti-IgD	6993 ipm	646 ipm

in einer Milzzellpopulation von C57 Bl 6 Mäusen bestimmt werden. Dazu wurde das anti-IgD - Serum mit Fluoreszeinylthioureidokapronsäure (FTC) fluoreszenzmarkiert. Damit konnten nun in direkter Immunfluoreszenz die IgD-positiven B-Lymphozyten sichtbar gemacht werden.

$6 \cdot 10^7$ Mausmilzzellen von C57 Bl 6 Mäusen wurden mit 1 ml anti-IgD-Serum verschiedener Verdünnung versetzt und mit Komplement behandelt. Bei den nach der Antiserumbehandlung übriggebliebenen Zellen wurde die Anzahl der IgD-positiven Zellen bestimmt und anschließend wurden diese Zellen mit anti-IgD - Antikörpern stimuliert. Die DNA-Syntheserate wurde nach 68 Stunden bestimmt. Abb. 16 zeigt, daß bei der Komplementkontrolle ungefähr 22 % der Zellen IgD-positiv

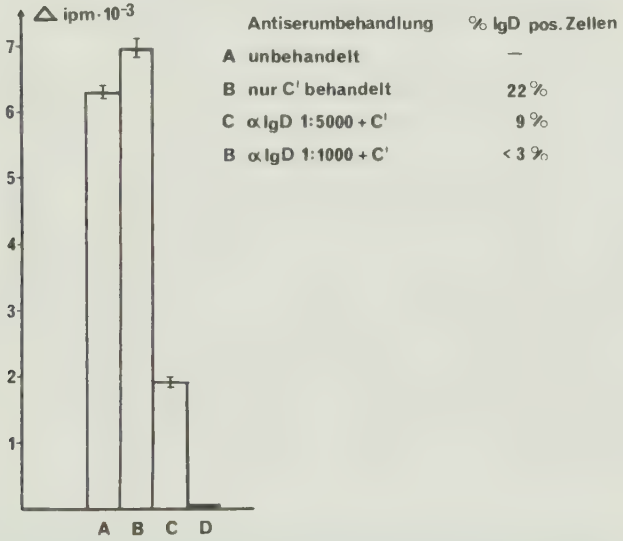

Abb. 16: Spezifität der Stimulation von Mausmilzzellen mit anti-IgD-Antikörpern

C57 Bl 6 Milzzellen wurden mit anti-IgD und Komplement behandelt. Danach wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenz die Anzahl der IgD-positiven Zellen bestimmt. 100 µl der Zellen wurden bei einer Zelldichte von $5 \cdot 10^6$/ml in Gegenwart von Humanserum und 25 µl anti-IgD 1 : 5000 verdünnt kultiviert. Nach 68 h wurde der 3H-Thymidineinbau bestimmt. Pulsdauer: 20 h.
Basisstimulation: A 1290 ± 262; B 1066 ± 217; C 1496 ± 122; D 884 ± 113

sind. Diese Zellen lassen sich auch gut mit anti-IgD-Antikörpern stimulieren. Bei einer Behandlung der Maus Milzzellen mit anti-IgD der Verdünnung 1 : 1000 und Komplement finden sich danach nur noch weniger als 3 % IgD-positive Zellen. Diese Zellen lassen sich auch nicht mehr durch anti-IgD-Antikörper zur Proliferation anregen. Es liegt also eine über den IgD-Rezeptor der Zelle vermittelte Aktivierung vor.

3.3. Stimulation von Maus Milzzellen mit anti-IgD-Antikörpern nach Entfernung der T-Lymphozyten

Maus Milzzellen von C 57 Bl 6 Mäusen wurden mit einem anti-Thy 1.2-Antiserum und Komplement behandelt. Nachdem so die T-Zellen fast quantitativ entfernt waren, wurden die restlichen Zellen mit anti-IgD-, $F(ab')_2$-anti-Maus-μ-Antikörpern, LPS, einem B-Zellmitogen, und Concanavalin A, einem T-Zellmitogen, kultiviert. Nach 68 Stunden wurde die DNA-Syntheserate bestimmt. Abb. 17 zeigt, daß die Stimulation durch anti-Maus-IgD-Antikörper ebenso wie die durch $F(ab')_2$-anti-Maus-μ-Antikörper oder LPS weitestgehend T-Zell-unabhängig ist. Durch die relative B-Zellanreicherung wird die Stimulierbarkeit sogar erhöht. Die Kontrolle mit dem T-Zellmitogen ConA zeigt nach Entfernung der T-Zellen keine Reaktion mehr.

3.4. Stimulation von Maus B-Lymphozyten mit anti-kappa- bzw. anti-IgM-Antikörpern nach Entfernung der IgD-positiven B-Zellen

Bei Verwendung von optimalen Dosen der anti-Immunglobuline ist die DNA-Syntheserate bei Stimulation mit $F(ab')_2$-anti-kappa- bzw. $F(ab')_2$-anti-IgM-Antikörpern bedeutend höher als bei Stimulation mit anti-IgD-Antikörpern. Nach Abb. 12 scheint bei gleichzeitiger Verwendung von $F(ab')_2$-anti-kappa- und $F(ab')_2$-anti-IgM-Antikörpern auch eine teilweise additive Wirkung sichtbar zu werden. Diese Ergebnisse führ-

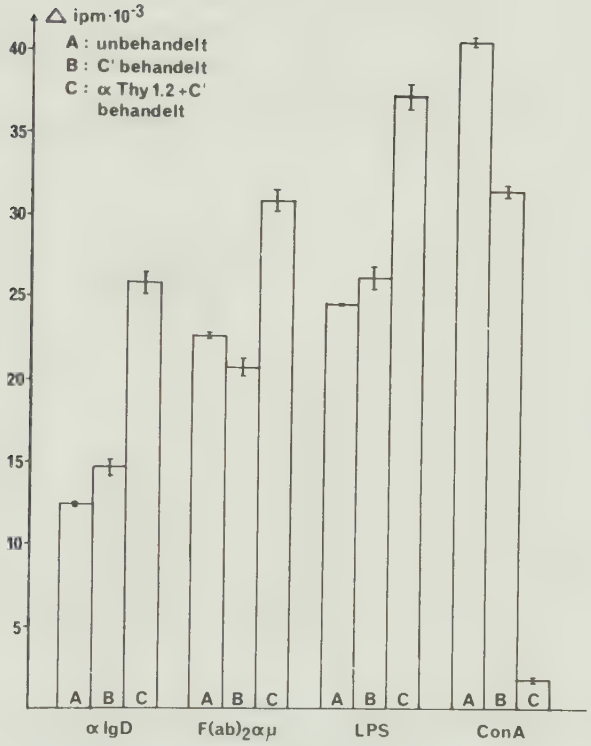

Abb. 17: Stimulation von Mausmilzzellen mit anti-IgD-Antikörpern nach Entfernung der T-Lymphozyten

C 57 Bl 6 Milzzellen wurden mit einem monoklonalen anti-T-Zellantikörper und Komplement behandelt. Danach wurden 100 µl der Zellen bei einer Zelldichte von $2{,}5 \cdot 10^6$/ml in Gegenwart von 2,5 % Humanserum mit anti-Ig-Antikörpern kultiviert.

anti-IgD : 25 µl 1 : 5000 verdünnt/Kultur
$ZF(ab')_2$αIgM: 25 µl 1 : 3 verdünnt/Kultur
LPS : 0,5 µg/Kultur
ConA : 0,5 µg/Kultur

Nach 68 h Kulturdauer wurde der ^{3}H-Thymidineinbau bestimmt, Pulsdauer: 20 h
Basisstimulation (ipm): A 997 ± 41; B 1108 ± 42; C 1062 ± 93

ten zu der Vermutung, daß anti-kappa-, anti-IgM-, bzw. anti-IgD-Antikörper eventuell verschiedene oder zumindest nur teilweise überlappende Subpopulationen von B-Zellen stimulieren können. Es wurden deshalb Maus Milzzellen mit $F(ab')_2$-anti-Maus-kappa- bzw. $F(ab')_2$-anti-Maus-IgM-Antikörpern stimuliert, nachdem die IgD-tragenden B-Lymphozyten entfernt waren (Abb. 18). Die Effektivität der Zytolyse

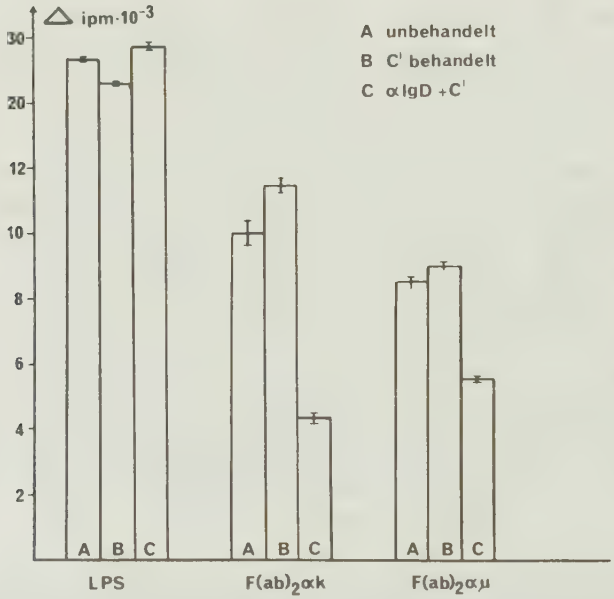

Abb. 18: Stimulation von Mausmilzzellen mit anti-kappa- bzw. anti-IgM-Antikörpern nach Entfernung der IgD-positiven Zellen

C 57 Bl 6 Milzzellen wurden mit anti-IgD und Komplement behandelt. Die überlebenden Zellen wurden über Ficolldichtegradienten-Zentrifugation abgetrennt. Davon waren nur noch weniger als 3 % IgD positiv. Die Zellen der Komplementkontrolle B wurden auf $2{,}5 \cdot 10^6$/ml eingestellt, die Gruppen A und C auf das entsprechende Volumen gebracht. 100 µl dieser Zellen wurden in Gegenwart von 2,5 % Humanserum mit 25 µl $F(ab')_2\alpha$Mκ 1 : 5, 25 µl $F(ab')_2\alpha$IgM 1 : 10 bzw. 1 µg LPS kultiviert. Nach 68 h ^{3}H-Thymidineinbaubestimmung, Pulsdauer: 19 h
Basisstimulation (ipm): A 1290 ± 262; B 1066 ± 217; C 884 ± 113

wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenz verifiziert. Nach Antiserum und Komplementbehandlung wurden die Zellen der Komplementkontrolle auf $2,5 \cdot 10^6$/ml eingestellt. Alle anderen Gruppen wurden auf das gleiche Volumen verdünnt, so daß eine relative Anreicherung von bestimmten Subpopulationen vermieden wurde. Diese Zellen ließen sich dann mit anti-IgD-Antikörpern nicht mehr zur Proliferation anregen. $F(ab')_2$-anti-Maus-kappa- und $F(ab')_2$-anti-Maus-μ-Antikörper erzeugten aber beide noch eine signifikante Stimulation, wenngleich der Stimulationsindex in unterschiedlichem Maße herabgesetzt war. Bei Stimulation mit $F(ab')_2$-anti-kappa-Antikörpern war der ^{3}H-Thymidineinbau um 64 % gehemmt, bei Stimulation mit $F(ab')_2$-anti-μ-Antikörpern nur um 43 % gegenüber der Milzzellpopulation, die noch IgD-positive Zellen mit einschloß. Anti-IgD-, anti-kappa- und anti-IgM-Antikörper scheinen also in der Tat verschiedene, sich jedoch überlappende Subpopulationen von Maus B-Lymphozyten zu stimulieren, wobei $F(ab')_2$-anti-IgM-Immunglobulin hauptsächlich IgD-negative Zellen stimuliert, während $F(ab')_2$-anti-kappa-Immunglobuline zum großen Teil IgD-positive Zellen erfassen, jedoch auch Teile der IgD-negativen Zellen aktivieren können.

4. VERSUCHE ZUR DARSTELLUNG DER SEQUENTIELLEN PROLIFERATION UND MATURIERUNG VON MAUS B-LYMPHOZYTEN

In den bisher beschriebenen Experimenten wurde gezeigt, daß sich Maus B-Lymphozyten durch anti-Immunglobulin Antikörper zur DNA-Synthese stimulieren lassen. Als nächstes erhob sich nun die Frage, ob sich daran eine echte Zellteilung anschließt und dann eventuell eine Möglichkeit zur Maturierung in Immunglobulin produzierende und sezernierende Zellen besteht. Um dieses Problem zu bearbeiten, war es zunächst einmal notwendig zu zeigen, daß eine Stimulation mit anti-Immunglobulinseren nicht von sich aus zu einer Immunglobulinproduktion führt. Bei Verwendung des üblichen Testantigens, rote

Blutzellen vom Schaf (SRBC), konnte im hämolytischen Plaquetest keine Antikörperproduktion nachgewiesen werden. Da anti-Immunglobulin-Antikörper jedoch sicherlich polyklonal stimulieren, schien ein Testsystem notwendig, das polyklonale Immunglobulinsekretion zu messen erlaubt. Versuche mit dem von Gronowicz (61) beschriebenen Protein A Plaquetest zeigten sich mit den verwendeten Antiseren im Maussystem als unzuverlässig. Erst nach Modifikation des reversen Plaquetestes von Molinaro (60) war ein Testsystem gefunden, das zuverlässig und reproduzierbar arbeitete. Dabei werden als Indikatorerythrozyten SRBC verwendet, an die ein Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin - Antikörper gekoppelt wird.

4.1. Stimulation von Maus Milzzellen mit $F(ab')_2$-anti-Maus-kappa- bzw. anti-IgD - Antikörpern

Milzzellen von C 57 Bl 6 Mäusen wurden mit LPS, $F(ab')_2$-anti-Maus-kappa- bzw. anti-IgD - Antikörpern kultiviert. Nach einer Kulturdauer von 3 und 5 Tagen wurden die Zellen mit dem reversen Plaquetest auf Immunglobulinsekretion getestet. Der ^{3}H-Thymidineinbau wurde in Parallelkulturen nach 3 Tagen bestimmt. Wie Tab. 2a zeigt, induziert das B-Zellmitogen LPS in einer beträchtlichen Zahl von Zellen eine Immunglobulinproduktion. Sowohl $F(ab')_2$-anti-Maus-kappa- als auch besonders anti-Maus-IgD-Antikörper ergeben eine signifikante Stimulation zur Immunglobulinproduktion, jedoch deutlich weniger als das B-Zellmitogen LPS. Da in diesem Versuch ganze Milzzellpopulationen verwendet wurden, war es möglich, daß anti-Immunglobulin-Antikörper die B-Zellen expandierten und in Kultur vorhandene T-Helferzellen einige der aktivierten B-Zellen zur Immunglobulinproduktion reifen ließen. Da die T-Zellen nicht extra aktiviert wurden, konnten sie auch nur einem relativ kleinen Prozentsatz der B-Lymphozyten zur Differenzierung verhelfen.

Tab. 2a: Stimulation von Maus Milzzellen mit $F(ab')_2$-anti-kappa- bzw. anti-IgD - Antikörpern

100 µl C57 Bl 6 Milzzellen ($5 \cdot 10^6$/ml, 2,5 % Humanserum) mit 0,5 µg LPS, 25 µl αIgD 1 : 2500 bzw. 25 µl $KF(ab')_2$ Mκ 1 : 10 kultiviert. Die Zellen wurden täglich gefüttert. Am Tag 3 und 5 der Kultur wurden die Zellen auf PBZ in einem polyklonalen reversen Plaquetest getestet. In Parallelansätzen wurde entsprechend der ^3H-Thymidineinbau nach 68 h bestimmt. Pulsdauer: 19 h

	Tag 3 PBZ/10^6	Tag 5 PBZ/10^6	ipm/Kultur (Tag 3)
Kontrolle	128	205	997 ± 41
LPS	4450	4517	24264 ± 408
$KF(ab')_2$αMκ	97	597	12117 ± 170
anti-IgD	445	1385	22610 ± 294

Tab. 2b: Stimulation von Maus B-Lymphozyten mit $F(ab')_2$-anti-kappa bzw. anti-IgD Antikörpern

Entsprechend a; jedoch wurden die Milzzellen vor Kultur mit einem monoklonalen anti-T-Zell-antikörper und Komplement behandelt.

	Tag 5 PBZ/10^6	ipm/Kultur (Tag 3)
Kontrolle	176	1062 ± 93
LPS	13333	38789 ± 1511
$KF(ab')_2$αMκ	181	26374 ± 1193
anti-IgD	166	31115 ± 1418

4.2. Stimulation von Maus B-Lymphozyten mit anti-Immunglobulin-Antikörpern

Es wurde deshalb das entsprechende Experiment mit Maus Milzzellen durchgeführt, bei denen durch einen monoklonalen anti-T-Zellantikörper und Komplementbehandlung die T-Zellen entfernt waren. Tab. 2b zeigt, daß mit LPS die B-Lymphozyten gut zur Immunglobulinproduktion angeregt werden können. Mit anti-IgD- bzw. $F(ab')_2$-anti-Maus-kappa-Antikörpern ist jedoch nach weitgehender Entfernung der T-Zellen keine Differenzierung mehr möglich; der ^3H-Thymidineinbau ist jedoch dadurch in keiner Weise beeinträchtigt. Anti-Immunglobulinantikörper führen also nur zu einer Zunahme der DNA-Synthese, bewirken jedoch von sich aus keine Maturierung.

4.3. Maturierungsversuche

Als nächstes wurde nun versucht zu zeigen, daß erstens anti-Ig - Seren eine wirkliche Zellteilung induzieren, und daß die so aktivierten Zellen auch noch differenzierbar sind. Um diese Probleme experimentell anzugehen, ist es sicher wichtig sich zu vergegenwärtigen, daß die Differenzierung von aktivierten Maus B-Lymphozyten größenordnungsmäßig noch viel stärker durch Interaktionen mit dem Fc-Rezeptor (56, 57) und die Anwesenheit von löslichem anti-Immunglobulin - Antikörper gehemmt wird, als dies für die Proliferation beschrieben wurde. Es wäre deshalb ein wichtiger Schritt, lösliches anti-Immunglobulin während der Maturierungsphase zu entfernen und der aktivierten Zelle zu ermöglichen, ihre durch anti-Immunglobulin modulierte Oberfläche neu zu reorganisieren. Um dies zu erreichen, wurde folgendes System aufgebaut: Milzzellen von C 57 Bl 6 Mäusen wurden mit SRBC, $F(ab')_2$-anti-IgM- bzw. anti-IgD-Antikörpern in Gegenwart von Humanserum bei einer Zelldichte von $5 \cdot 10^6$/Ansatz kultiviert. Nach drei Tagen wurde von einem Teil dieser Zellen der ^3H-Thymidineinbau bestimmt. Die übrigen Zellen wurden zweimal gewaschen und von jeder Gruppe

wurden $7 \cdot 10^6$ Zellen in je vier syngene Mäuse, die einen Tag vorher mit 750 rad sublethal bestrahlt worden waren, intravenös transferiert. Ein gewisser Prozentsatz dieser Zellen wandert in die Milz der bestrahlten Maus ein, und es besteht währenddessen auch genug Zeit, um die Zelloberfläche der Zellen von restlichem anti-Immunglobulin zu säubern und alle Oberflächenrezeptoren wieder auszudrücken. Nach sieben Tagen wurden aus den Milzen dieser Mäuse wieder die Lymphozyten gewonnen und mit verschiedenen Mengen an SRBC-spezifischen Helfer-T-Zellen in Kultur gebracht. Die SRBC-spezifischen Helfer-T-Zellen wurden folgendermaßen hergestellt: C 57 Bl 6 Mäuse wurden mit 10^8 SRBC intraperitoneal immunisiert. Nach 4 Tagen wurden die Milzzellen gewonnen und die T-Zellen durch Passage durch Nylonwollesäulen angereichert. In Zellkultur bekamen die Zellen als Antigen SRBC und wurden nach fünf Tagen im hämolytischen Plaquetest auf Produktion SRBC-spezifischer Antikörper geprüft. Als zusätzliche Kontrolle wurden auch frisch gewonnene Milzzellen nur in der 2. Kultur verwertet. Damit könnte ein negativer Selektionsprozeß bei den in der ersten Kultur nur mit Medium kultivierten Zellen aufgedeckt werden. Wie Abb. 19 zeigt, produzieren Kulturen, deren B-Lymphozyten in der ersten Kulturperiode keine direkte Aktivierung bekamen, kaum schafspezifische Antikörper. Auch eine Milzzellpopulation, die erst frisch für die 2. Kultur isoliert wurde und somit nicht den negativen Einflüssen einer unstimulierten Kultur ausgesetzt war, konnte nur eine sehr geringe Anzahl von SRBC-spezifischen PBZ generieren. B-Zellen, die in der ersten Kultur SRBC als Antigen erhielten, ergaben bei Restimulation mit SRBC in der zweiten Kulturperiode erwartungsgemäß eine hohe Anzahl von Plaque-bildenden Zellen. Wichtig jedoch ist, daß auch Zellen, die in der ersten Kultur durch $F(ab')_2$-anti-IgM- bzw. anti-IgD-Antikörper anstelle von Antigen aktiviert wurden, dann fast genauso viel Plaque bildende Zellen generieren, wenn sie in der zweiten Kultur mit SRBC restimuliert werden, welche auch die zu-

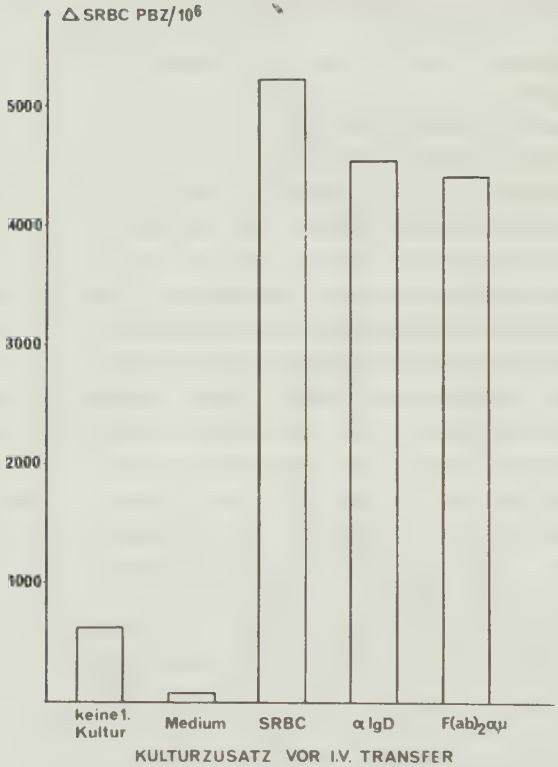

Abb. 19: Maturierung von anti-Immunglobulin-stimulierten Milzzellen mit Schaf-spezifischen Helfer-T-Zellen

1. Kultur: 0,5 ml C57 Bl 6 Milzzellen (10^7/ml) wurden mit 5 · 10^6 SRBC, 75 µl $F(ab')_2$αIgM-, bzw. 100 µl anti-IgD - Antikörper 1 : 5000 oder Medium in Gegenwart von 2,5 % Humanserum kultiviert. Am 4. Tag i.v. Transfer in syngene, bestrahlte Mäuse. ^{3}H-Thymidineinbau nach 72 h (es wurden 10 % der Kulturnäpfe in Mikronäpfe transferiert und für 20 h gepulst.
Medium: 1148 ± 432, $F(ab')_2$αµ: 16311 ± 1498, αIgD: 6341 ± 816 ipm
2. Kultur: Nach 7 Tagen, Kultur der Milzzellen der i.v. transferierten Mäuse mit über Nylonwolle gereinigten SRBC-spezifischen Helfer-T-Zellen (Milzzellen: Helfer-T-Zellen 1 : 1), 5 · 10^6 SRBC als Antigen. Als Kontrolle auch entsprechender Kulturansatz mit syngenen Milzzellen, die frisch gewonnen worden waren. Am Tag 5 Bestimmung der PBZ in hämolytischem Plaquetest nach Jerne (Σ IgM + IgG).

gegebenen T-Zellen zu starker Helferfunktion aktivieren. Anti-Immunglobulin - Antikörper expandieren demnach im Sinne einer echten Proliferation, entsprechend dem spezifischen Antigen, gleichermaßen die SRBC-spezifischen B-Lymphozytenklone in einer Weise, die keine unphysiologische "Proliferationssackgasse" darstellt, sondern die eine anschließende Maturierung mit Hilfe von T-Helferzellen ermöglicht.

V. DISKUSSION

Die Entstehung einer Antikörper produzierenden Plasmazelle aus einem ruhenden B-Lymphozyten ist schon seit Jahren Mittelpunkt vieler experimenteller Systeme. Nossal entwickelte die Vorstellung, daß bis zur Entstehung einer Plasmazelle mindestens 8 Proliferationszyklen notwendig sind. Dieses Modell ging zunächst davon aus, daß der Kontakt des Antigens mit der B-Zelle zu den notwendigen Zellteilungen und auch direkt zur Immunglobulinproduktion führt (71).

In den folgenden Jahren führten besonders Arbeiten, die die Wirkung von B-Zellmitogenen - wie z.B. bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) - als polyklonale B-Zellaktivatoren untersuchten, zu Modellen der Plasmazelldifferenzierung (72). Dabei sollte eine Aktivierung der B-Zellen durch thymusunabhängige Antigene oder B-Zellmitogene nach einigen Proliferationszyklen als direkte und zwingende Folge die Differenzierung zu Immunglobulin produzierenden Zellen nach sich ziehen. Für den Großteil aller Antigene, die sogenannten thymusabhängigen Antigene, wurde jedoch schon früh der wichtige Einfluß von T-Lymphozyten auf die Entwicklung von Immunglobulin produzierenden Zellen erkannt (73). Daraus ergaben sich Arbeiten, die den Mechanismus der T-Zell - B-Zell-Kooperation untersuchten. 1972 beschrieben Schimpl und Wecker einen von T-Zellen produzierten antigen-unspezifischen löslichen Faktor, der die Differenzierung von nach Antigenkontakt proliferierenden Zellen ermöglicht (2,3,4,5,7,25). Ausgehend von diesen Experimenten entwickelten sie ein Modell der sequentiellen Proliferation und Maturierung von B-Lymphozyten. Dabei untergliedert sich der Differenzierungsprozeß in mehrere Schritte, die getrennt und nacheinander initiiert und reguliert werden (Abb. 20).

Die B-Zelle durchläuft dabei mindestens drei zeitlich nacheinander ablaufende Reaktionen. Zuerst wäre der Kontakt des Antigens mit dem spezifischen Immunglobulinrezeptor notwendig, um das Signal für Proliferation zu geben. Bei diesem

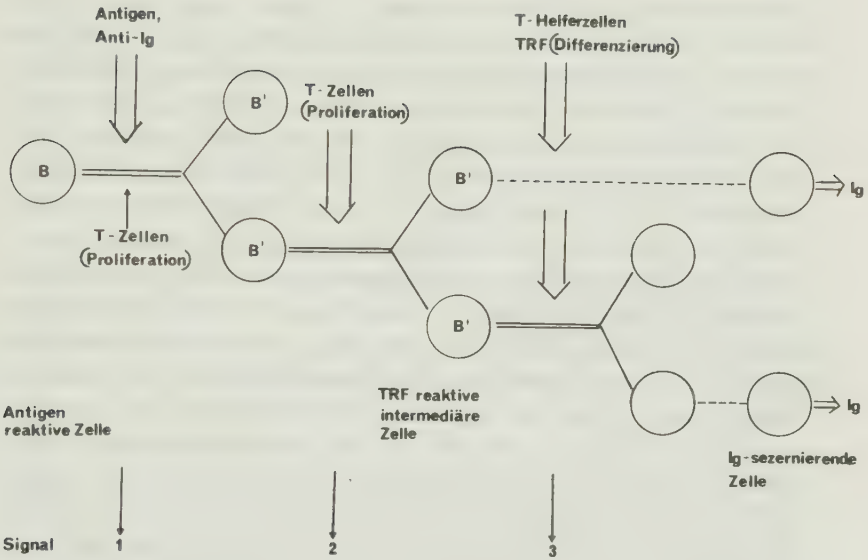

Abb. 20: Modell zur B-Zelldifferenzierung

ersten Schritt können bestimmte Antigene wie z.B. SRBC die Proliferation alleine induzieren (4,5). Es muß jedoch damit gerechnet werden, daß andere Antigene auch in diesem Schritt eine T-Zellhilfe benötigen.

Als zweites wäre ein Signal zur fortdauernden Proliferation notwendig (1), was wahrscheinlich durch T-Zellfaktoren gegeben wird. Als drittes wäre für die sich teilenden "intermediären" B-Zellen ein Antigen-unspezifisches T-Zellprodukt, der T-Zellen-ersetzende Faktor (TRF), notwendig, um das Signal für Differenzierung zur Antikörperproduktion zu geben.

Alle diese Schritte besitzen auch ihre eigenen Regulationsmöglichkeiten. Ein wichtiges Ziel war nun, diese Schritte experimentell so zu trennen, daß erstens die verschiedenen Signale eindeutig voneinander abgrenzbar wären, zweitens dadurch die Regulationsmöglichkeiten bei den einzelnen Schrit-

ten analysiert werden können und drittens auch die biochemischen Vorgänge der einzelnen Teilschritte untersuchbar würden. Dafür war ein Mitogen notwendig, das nur die Zellteilung stimuliert und die damit aktivierten Zellen aber noch für die Antikörpersynthese von T-Zellhilfe abhängig und empfänglich macht, die z.B. in Form des Differenzierungsfaktors TRF bereitgestellt werden könnte. Für dieses Vorhaben schienen anti-Immunglobulin - Antikörper ideal zu sein. Im Maussystem war es allerdings für viele Jahre nicht gelungen, B-Lymphozyten mit anti-Immunglobulin - Antikörpern zur Proliferation zu aktivieren (11). Dies beeinflußte, ungeachtet der positiven Ergebnisse im Kaninchen (9)- und Humansystem (10), sehr stark die Theorien über die Aktivierung von B-Zellen in der Weise, daß den Oberflächenimmunglobulinen keine direkte Signalübermittlerfunktion, sondern höchstens eine passive Rolle im Sinne einer Antigenfixation bei Thymus-unabhängigen Antigenen bzw. einer Koppelung an T-Lymphozyten über Antigen bei Thymus-abhängigen Antigenen zugestanden wurde (12,49).

Im Gegensatz dazu beschrieb Parker (13) eine Aktivierung der DNA-Synthese von Maus-Milzzellen bei Verwendung von anti-Immunglobulinantikörpern, die an Polyacrylamidkügelchen gebunden waren. Kurz danach gelang es der Arbeitsgruppe um Weiner (14) mit löslichem anti-Immunglobulinserum bei Mäusen, die allerdings älter als 7 Monate sein mußten, eine Aktivierung der DNA-Synthese nachzuweisen. Diese Ergebnisse blieben jedoch nicht unwidersprochen und wurden nicht im Sinne einer Signalübertragungsfunktion der Immunglobulinrezeptoren interpretiert (15,50).

Diese widersprüchlichen Ergebnisse waren der Anlaß zu meiner Doktorarbeit.

Abb. 1 zeigt, daß sich Maus-Milzzellen von 12 Wochen alten Mäusen mit löslichem anti-Immunglobulin-M-Serum sehr gut zur DNA-Synthese aktivieren ließen. Die Versuchsprotokolle der hier beschriebenen Experimente und der mit negativem

Ergebnis in der Literatur beschriebenen Versuche unterschieden sich in zwei wichtigen Punkten. Erstens in der Wahl des Serums für die Kultur. Die in der Literatur beschriebenen Experimente wurden alle in der Gegenwart von FKS durchgeführt. Abb. 1 und 3 zeigen jedoch, daß nur in Gegenwart von Humanserum eine gute Proliferation durch anti-IgM - Antikörper zu erreichen ist.

Zweitens ist noch die unterschiedliche Spezies herkunft der verwendeten anti-Immunglobulinseren von Bedeutung. Bisher waren nur Antiseren von Kaninchen verwendet worden. In Abb. 9 wird nun deutlich gezeigt, daß anti-Immunglobulin - Antikörper, die aus der Ziege gewonnen wurden, im Gegensatz zu anti-Immunglobulin - Antikörpern aus Kaninchen eine gute Stimulationsfähigkeit besitzen.

Diese gute Proliferationsfähigkeit von Maus-Milzzellen auf Ziege-anti-Maus-IgM - Antikörper war ab einem Alter von wenigen Wochen vorhanden. Ebenso war der Proliferationsunterschied bei Verwendung von Humanserum bzw. FKS in allen Altersklassen deutlich (Abb. 5). Diese Ergebnisse, nämlich eine Proliferationsstimulation durch Interaktion mit dem Immunglobulinrezeptor der Zelle, blieben jedoch nicht unwidersprochen. Die gesteigerte DNA-Syntheserate wurde nicht als Zellproliferation, sondern als durch die Kulturbedingungen gesteigerte Basisproliferation (17), Serumeffekte, Einflüsse von T-Zellen, Makrophagen oder Wechselwirkungen mit Fc-Rezeptoren ohne Beteiligung des membranständigen Immunglobulins (50) interpretiert.

Um diese Einwände zu entkräften, wurden weitere Experimente unternommen. Sowohl die Kinetik der Reaktion (Abb. 4) als auch besonders die autoradiographischen Untersuchungen (Abb. 8) wiesen ganz deutlich darauf hin, daß anti-Immunglobulin - Antikörper eine echte Proliferation von Zellen induzierten. Das zeigte auch die Hemmbarkeit des durch anti-IgM - Antikörper induzierten ^{3}H-Thymidineinbaues mittels zugegebenem IgM.

Wichtig war nun noch die Frage, ob anti-Immunglobulin - Antikörper direkt die B-Zelle aktivieren können oder ob T-Lymphozyten und Makrophagen an der Aktivierung beteiligt sind. Da anti-Immunglobulin - Antikörper auch B-Zellen von thymuslosen nu/nu Mäusen, die nur sehr wenige bis keine funktionellen T-Zellen besitzen, zur Proliferation bringen können, scheinen T-Zellen für die Aktivierung nicht notwendig zu sein. Auch in nu/nu Milzzellen wurde jedoch unter bestimmten Bedingungen eine geringe Anzahl von T-Zellen beschrieben (67). Deshalb wurden die Milzzellen von nu/nu Mäusen auch noch mit einem anti-Thy 1.2.-Serum und Komplement behandelt. Doch auch das hatte keinen Einfluß auf die Stimulierbarkeit der B-Zellen durch anti-Immunglobulin - Antiseren, weder bei Bestimmung des ^{3}H-Thymidineinbaues (Abb. 6) noch bei autoradigraphischer Untersuchung (Abb. 8).

Die Rolle der Makrophagen bei der Stimulation von B-Zellen durch anti-Immunglobulinantikörper ist nicht so leicht zu klären, da die verwendeten Methoden nicht zu einer vollständigen Makrophagenentfernung führen. Bei Entfernung der adhärenten Zellen über Sephadex G-10 - Säulen konnte bei Anwesenheit von 2-Mercaptoäthanol im Medium eine Makrophagenabhängigkeit nicht nachgewiesen werden. Es ist aber möglich, daß die wenigen nicht abgetrennten Makrophagen durch 2-Mercaptoäthanol soweit aktiviert wurden, daß sie die notwendigen Funktionen erfüllen konnten. Dies wurde später durch Mongini und Mitarbeiter (51) erhärtet. Diese Arbeitsgruppe entfernte die Makrophagen durch Adhärenz an Plastikschalen und anschließende zweimalige G-10 - Filtration oder durch Silika, eine für Makrophagen giftige Substanz. Bei Anwesenheit von 2-Mercaptoäthanol im Medium fanden sie keine Makrophagenabhängigkeit, wohl aber bei Abwesenheit von 2-Mercaptoäthanol im Medium. Hattori und Mitarbeiter (52) bestätigten diese Ergebnisse und fügten hinzu, daß bei Verwendung von $F(ab')_2$-anti-Immunglobulin - Antikörpern auch in Abwesenheit von 2-Mercaptoäthanol eine Makrophagenunabhängigkeit vorliegt.

Betrachtet man nun genauer die beiden offensichtlich entscheidenden Unterschiede zwischen dem hier beschriebenen System und den Ergebnissen in der bisherigen Literatur, nämlich Verwendung von Humanserum und anti-Immunglobulin - Antikörper von der Ziege, scheint es zunächst sehr schwierig, beide Einflüsse theoretisch auf einen gemeinsamen Nenner zu bringen. Vergegenwärtigt man sich aber, daß hitzeinaktiviertes Humanserum reich an aggregiertem IgG ist, das an Fc-Rezeptoren binden kann, und daß Alexander und Sanders (18) für Kaninchenantikörper eine gegenüber Ziegenantikörper höhere Affinität zum Fc-Rezeptor bei menschlichen B-Lymphozyten nachwiesen, ergibt sich folgende Interpretationsmöglichkeit: Der gegen die Ig-Rezeptoren einer B-Zelle gerichtete Antikörper wirkt aktivierend, wenn sich sein Fc-Teil nicht gleichzeitig an einem benachbarten Fc-Rezeptor bindet. Findet dies aber statt, unterbleibt die Stimulation der B-zelle.

Danach müßte man ein Modell postulieren, in dem der Immunglobulinrezeptor der B-Zelle die Funktion eines positiven Signalüberträgers im Sinne der Proliferationsinduktion einnimmt und der Fc-Rezeptor ein negatives Signal im Sinne einer Proliferationshemmung überträgt. Andererseits besäße ein anti-Immunglobulin - Antikörper innerhalb eines Moleküles zwei entgegengesetzte Potenzen. Erstens die Antigenbindungsstelle, die durch Interaktion mit dem Immunglobulinrezeptor Proliferation induziert, zweitens den Fc-Teil, der bei Bindung an den Fc-Rezeptor durch eine Vernetzung mit dem Immunglobulinrezeptor Proliferationshemmung hervorruft. Diese Art von Modell wurde schon vor längerer Zeit von Sinclair (19) vorgeschlagen, um die negative Rückkoppelung durch spezifischen Antikörper in Anwesenheit von Antigen zu erklären. Auch Unanue (20) wies auf ein ähnliches Modell hin, als er fand, daß anti-IgM - Antikörper eine nachfolgende Stimulation mit dem B-Zellmitogen LPS behinderten, während die $F(ab')_2$-Fragmente keinen Einfluß darauf hatten.

Mit Hilfe dieses Modells (Abb. 21) wäre auch leicht der Erfolg Parkers' (13) mit an Polyacrylamidkügelchen gekoppelten anti-Immunglobulin - Antikörpern zu erklären, da die Bindung der anti-Immunglobulin - Antikörper an eine feste Matrix die Interaktion des Fc-Teils mit dem Fc-Rezeptor verhindern würde.

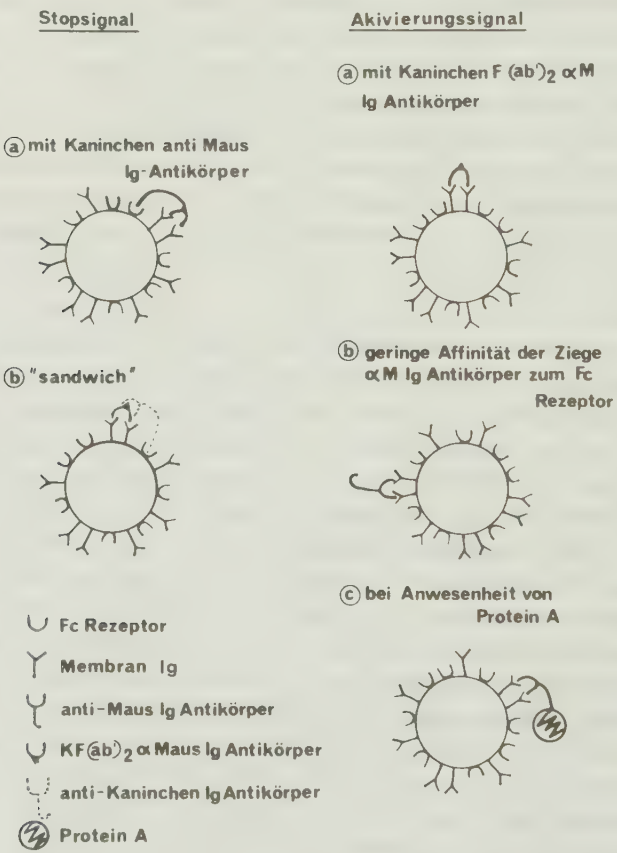

Abb. 21: Schematische Darstellung zum negativen Signal, vermittelt durch den Fc-Rezeptor.

Die in meiner Arbeit beschriebenen Experimente untermauern stark diese Hypothese:

1) Intakte Ziege-anti-Maus-IgM - Antikörper stimulieren wesentlich besser als Kaninchen-anti-Maus-IgM - Antikörper, entsprechend unterschiedlicher Affinitäten zum Fc-Rezeptor (Abb. 9).
2) Kaninchen-anti-Maus - κ - Antikörper ergeben als intaktes IgG-Molekül keine Proliferationsstimulation. Nach enzymatischer Abspaltung des Fc-Teiles induziert das divalente $F(ab')_2$-Fragment eine hohe Proliferation von B-Lymphozyten (Abb. 10).
3) Verhindert man eine Bindung des Fc-Teils von nicht stimulierendem intaktem Kaninchen-anti-Maus-kappa - Antikörper durch Komplexierung desselben an Protein A, bekommt man eine gute Proliferationsinduktion (Abb. 11).
4) Andererseits kann man die Stimulation von $F(ab')_2$-anti-Immunglobulin - Antikörpern durch Zumischen von intaktem Kaninchen-anti-Maus-kappa - Antikörper hemmen (Abb. 12). Dieses Experiment unterstreicht auch die Dominanz des negativen Signals, das über den Fc-Rezeptor vermittelt wird.
5) Das negative Signal, das über den Fc-Rezeptor gegeben wird, ist auch durch folgende Versuchsanordnung nachzuweisen: Man versetzt B-Lymphozyten mit einem Ziegen-$F(ab')_2$-anti-Maus-IgM - Antiserum, das normalerweise stimulierend wirkt; dazu gibt man nun Kaninchen-anti-Ziege-7S - Immunglobulin. Auch hier kommt es dann zu einer Vernetzung von Immunglobulinrezeptor und Fc-Rezeptor, aber die Bindungsstelle für beide liegt auf verschiedenen Molekülen. Mit diesem Experiment, bei dem die Stimulation der B-Zellen ausbleibt, wird die Bedeutung der Vernetzung von Immunglobulinrezeptor und Fc-Rezeptor hervorgehoben und die Möglichkeit, daß durch Bindung von Fc-Teil und Fc-Rezeptor die Stimulationsfähigkeit der Antigenbindungsstelle verändert wird, unwahrscheinlich. Der Fc-Rezeptor ist also auch der direkte Überträger des Negativsignals (Abb. 13).

6) Wie schon erwähnt, kann man sich vorstellen, daß Kaninchenantikörper durch ihre höhere Affinität zum Fc-Rezeptor ein stärkeres negatives Signal geben als Ziegenantikörper und aus diesem Grund Ziegenantikörper auch als intaktes IgG-Molekül eine gute Stimulation ermöglichen. Die als Argument zitierten Experimente von Alexander und Sanders (18) sind aber nicht direkt beweisend, da sie erstens an menschlichen Zellen durchgeführt wurden, zweitens die Bindung nur durch Immunfluoreszenzfärbbarkeit, aber nicht funktionell, untersucht wurde.
Die Stimulation von B-Lymphozyten mit intaktem Ziege-anti-Maus-IgM - Antikörper und dem daraus hergestellten $F(ab')_2$-Bruchstück, das, wie im RIA gezeigt, die gleiche Antigenbindungskapazität und auch Antigenbindungscharakteristik besitzt, zeigt aber auch hier deutlich, daß der Fc-Teil ein negatives Signal induziert, da das $F(ab')_2$-Fragment eine über die ganze Kinetik höhere stimulatorische Potenz aufweist (Abb. 14).

Während der Durchführung meiner Doktorarbeit erschien eine Publikation von Scribner, Weiner und Moorhead (53), in der auch diese Autoren auf ein über den Fc-Rezeptor gegebenes proliferationshemmendes Signal hinwiesen. Bei ihnen konnten B-Lymphozyten von jungen Mäusen nur mit $F(ab')_2$-anti-Immunglobulin - Antikörpern stimuliert werden, während B-Zellen von Mäusen, die älter als 7 Monate waren, sich auch durch intaktes Kaninchen-anti-Maus-IgM - Antiserum, jedoch mit geringerer Effizienz, stimulieren ließen. Sie zeigten auch, daß intaktes Kaninchen-anti-Immunglobulinserum bei jungen Mäusen die durch $F(ab')_2$-anti-Immunglobulin - Antikörper induzierbare Stimulation vollständig hemmt, während B-Zellen von älteren Mäusen nur unvollständig gehemmt werden. Es scheint somit hier eine Veränderung der Immunregulation mit dem Alter vorzuliegen, wahrscheinlich durch abnehmende Bindungsfähigkeit der Fc-Rezeptoren.

Zusammen betrachtet ergibt sich so ein Modell, bei dem die Vernetzung von Oberflächenimmunglobulin - univalentes F(ab') - anti-Immunglobulin zeigt keinen stimulierenden Effekt (Abb. 10) - das relevante Signal dafür ist, um eine Proliferation von Maus B-Lymphozyten zu erzeugen. Diese Proliferation kann aber durch Vernetzung von Immunglobulinrezeptor und Fc-Rezeptor der Zelle unterbunden werden. Ryan und Henkart (54) schlugen vor, daß Vernetzung von Fc-Rezeptoren untereinander ein Stopsignal bedeuten würde. Diese Möglichkeit kann durch die oben beschriebenen Versuche nicht eindeutig ausgeschlossen werden.

Ein solches Modell paßt sich auch zwanglos in die von Jerne (55) beschriebene, durch Idiotyp-Antiidiotyp - Wechselwirkung aufgebaute Netzwerkhypothese ein: Eine mit antiidiotypischem Antikörper besetzte B-Zelle ist in Ruhe, bedingt durch Vernetzung von Immunglobulinrezeptor und Fc-Rezeptor. Es gibt nun zwei Möglichkeiten, diese Zelle zur Proliferation zu bringen. Erstens durch Zugabe von Antigen: Antigen und Antiidiotyp konkurrieren um den Immunglobulinrezeptor; kann das Antigen den Antiidiotyp vom Immunglobulinrezeptor verdrängen, ist eine Proliferation möglich. Eine zweite Möglichkeit sollte die Verdrängung des Fc-Teiles des antiidiotypischen Antikörpers vom Fc-Rezeptor sein. Die Vernetzung von Immunglobulinrezeptoren über die Bindungsstelle durch antiidiotypischen Antikörper könnte in diesem Falle als Proliferationssignal zum Tragen kommen, da die negative Regulation über den Fc-Rezeptor unterbunden ist. Dieser Fall könnte in den Experimenten von Berman und Weigle (23) vorliegen, die Maus B-Lymphozyten durch Zugabe von Fc-Fragmenten zur Proliferation bringen konnten. Eine Feinregulierung in diesem Netzwerksystem wäre dann noch durch verschiedene Klassen und Subklassen des antiidiotypischen Antikörpers möglich, die durch ihre verschiedene Fc-Rezeptoraffinitäten auch verschieden starke negative Signale bewirken können. Eine ähnliche negative Regulation über den Fc-Rezeptor, wenn auch in anderen Größenordnungen, konnte in der Differenzierungsphase

von B-Lymphozyten, nämlich durch die Hemmung einer Antigen-spezifischen Immunantwort durch den spezifischen Antikörper (56,57), nachgewiesen werden.

Die hier und in der Literatur beschriebene Stimulation von B-Lymphozyten mit anti-Immunglobulin - Antikörpern (62,63) wurde immer nur mit Antikörpern durchgeführt, die gegen die µ- oder kappa-Kette oder das F(ab') - Stück gerichtet waren. Dies war auch vernünftig, da IgM/k die Hauptimmunglobulinklasse der Oberflächenimmunglobuline von Maus B-Lymphozyten darstellt. Ein Großteil der etwas reiferen B-Zellen trägt aber zusätzlich noch IgD auf der Zelloberfläche. Die Rolle des IgD-Oberflächenimmunglobulins ist aber noch weitgehend unklar. Die Rolle der IgD-Rezeptoren wurde lange Zeit in der thymusabhängigen Immunreaktion oder bei der Erzeugung der immunologischen Gedächtnisbildung gesehen. Endgültig konnten diese Fragen jedoch noch nicht geklärt werden.

Ausgehend von den oben beschriebenen Experimenten wurde deshalb die Frage untersucht, ob sich B-Lymphozyten auch mit anti-IgD - Antikörpern zur Proliferation stimulieren lassen. Dazu wurde ein monoklonaler, für Ig^b allospezifischer anti-IgD - Antikörper verwendet (8), der selbst der IgM - Klasse angehörte und somit kein negatives Signal über den Fc-Rezeptor vermitteln sollte. In der Tat konnte mit anti-IgD - Antikörpern eine Stimulation gefunden werden, die in der Kinetik mit der Stimulation durch anti-IgM - Antikörper vergleichbar war (Abb. 15). Quantitativ waren die Ausschläge bei Verwendung von anti-IgD - Immunglobulin jedoch geringer. Eine Kreuzreaktion des anti-IgD - Serums mit der µ- oder kappa-Kette konnte ausgeschlossen werden; außerdem war die Allospezifität eindeutig (Tab. 1).

Nach Entfernung der IgD-tragenden B-Lymphozyten durch Komplement-abhängige Zytolyse waren nur noch weniger als 3 % IgD-positive Zellen vorhanden. Diese Zellen ließen sich dann auch nicht mehr durch anti-IgD - Antikörper zur Proliferation aktivieren (Abb. 16), wohl aber noch durch anti-IgM- bzw. anti-

kappa - Antikörper. Der IgD-Rezeptor kann somit ebenfalls das Signal zum Proliferationsbeginn übermitteln. Dabei sind T-Lymphozyten nicht involviert (Abb. 17).

Erst die reiferen B-Zellen erwerben zusätzlich zum IgM-Rezeptor ihren IgD-Rezeptor (38,39). Damit im Einklang ist auch, daß sich B-Lymphozyten schon früher mit anti-IgM - Antikörpern stimulieren lassen, während anti-IgD - Antikörper erst bei etwas älteren Tieren stimulierend wirken (Daten nicht gezeigt). Sieckmann und Mitarbeiter (59) fanden bei Experimenten mit dem Fluoreszenz-aktivierten Zellensortierer, der es erlaubt, B-Lymphozyten nach ihrer klassenspezifischen Dichte von Oberflächenimmunglobulinen zu trennen, daß B-Zellen mit hoher Dichte an Oberflächenimmunglobulinen, die sich dabei aus relativ mehr IgD als IgM zusammensetzen (das entspricht relativ reifen B-Zellen), die auf anti-IgM- und anti-kappa - Antikörper reaktiven Zellen sind. Zellen, die als IgD-negativ sortiert wurden, ließen sich dabei nicht mehr durch anti-IgM- bzw. anti-kappa - Antikörper aktivieren. Im Gegensatz dazu wurde in den hier beschriebenen Versuchen gezeigt, daß B-Lymphozyten nach der Entfernung von IgD-positiven Zellen noch sehr wohl durch anti-IgM- bzw. anti-kappa - Antikörper aktivierbar sind (Abb. 18). Jedoch ist die Stimulierbarkeit in verschiedenem Maße herabgesetzt. Bei Verwendung von $F(ab')_2$-anti-IgM - Antikörpern ist die Stimulation um 43 %, bei $F(ab')_2$-anti-kappa - Antikörpern um 64 % gehemmt im Vergleich zur Zellpopulation, die noch alle IgD-positiven Zellen besitzt. Die Stimulation mit dem B-Zellmitogen LPS ist dabei völlig unbeeinflußt. Vergegenwärtigt man sich noch, daß bei gleichzeitiger Anwendung von optimalen Dosen von $F(ab')_2$-anti-kappa und $F(ab')_2$-anti-IgM - Antikörpern eine zumindest teilweise additive Wirkung zu beobachten ist (Abb. 12), sind dies starke Hinweise darauf, daß anti-IgM-, anti-kappa-, anti-IgD - Antikörper und bakterielles Lipopolysaccharid verschiedene oder zumindest nur teilweise überlappende Subpopulationen von B-Zellen stimulieren. Anti-IgM - Antikörper scheinen dabei hauptsächlich IgD-negative, anti-

kappa - Antikörper hauptsächlich IgD-positive, aber auch Teile der IgD-negativen Zellen, zu aktivieren.

Die Zusammensetzung der Oberflächenimmunglobuline ist auch ein Merkmal des Reife- und Funktionszustandes der Zelle. Dies ist für die Aktivierung dieser Zellen zur Immunglobulinproduktion und Sekretion von Bedeutung, da die Differenzierbarkeit und ihre Regulation sicherlich vom Entwicklungszustand der Zelle, der durch die Oberflächenimmunglobuline repräsentiert wird, abhängt.

Unter Zuhilfenahme eines reversen Plaquetestes, der Immunglobulinsekretion unabhängig von Antigenspezifität mißt, konnte gezeigt werden, daß anti-Immunglobulinantikörper im Gegensatz zu dem B-Zellmitogen LPS nur eine reine Zellteilung, aber keine Immunglobulinproduktion und Sekretion induzieren. Damit ist es möglich geworden, diese beiden Vorgänge eindeutig voneinander zu trennen. Wie oben angedeutet, werden je nach Spezifität des anti-Immunglobulinantikörpers jedoch unterschiedliche B-Zellsubpopulationen aktiviert. Es war nun die Frage zu lösen, ob die Aktivierung durch anti-Immunglobulinantikörper nicht in eine unphysiologische "Proliferationssackgasse" führt, oder ob vielleicht nicht B-Zellsubpopulationen expandiert werden, die dann gar nicht zur Immunglobulinproduktion differenziert werden können. Experimente mit verschiedenen Systemen, in denen nach Aktivierung durch anti-Immunglobulinantikörper ConA-Überstände, gereinigter TRF oder Helfer-T-Zellen zur Weiterdifferenzierung eingesetzt wurden, ließen keine eindeutige Immunglobulinproduktion nachweisen. Das könnte darauf zurückzuführen sein, daß der Differenzierungsschritt zur Immunglobulinproduktion und Sekretion durch weiter in Kultur anwesende anti-Immunglobulinantikörper gehemmt wird: entweder durch die laufend weitergehende Immunglobulinrezeptormodulation oder durch das starke Feedbacksignal (56,57) von eventuell noch geringfügig vorhandenem ungespaltenem anti-Immunglobulin bei $F(ab')_2$-Präparationen oder durch andere negative Signale, die selbst gespaltene anti-Maus-Ig - Antikörper auf die

Sekretion selbst ausüben könnten. Um diese Faktoren auszuschließen, wurden B-Zellen nach in vitro - Aktivierung intravenös in syngene, sublethal bestrahlte Mäuse transferiert. In der Zeit, die diese Zellen dann zum Einwandern in die Milz benötigen, war eine Reorganisation der Zelloberfläche mit Entfernung der überschüssigen anti-Immunglobulinantikörper möglich. Die Milzzellen wurden dann nach einer Woche mit Helfer-T-Zellen in vitro weiterkultiviert. Nach fünf Tagen ließ sich nun eine signifikante Immunglobulinproduktion nachweisen, die vergleichbar ist mit der Kontrolle, bei der beide in vitro - Kulturen mit dem Antigen SRBC durchgeführt wurden. Somit aktivieren anti-Immunglobulinantikörper entsprechend einem spezifischen Antigen B-Lymphozyten zur Proliferation. Die dann entstehenden Zellen sind in beiden Fällen vergleichbar durch Helfer-T-Zellen zur Immunglobulinproduktion und Sekretion zu aktivieren (Abb. 19).

Zusammenfassend beschreibt die vorliegende Arbeit neue Details der Aktivierung von Maus B-Lymphozyten durch anti-Immunglobulinantikörper. Die für die weitergehende Theorie der B-Zellaktivierung relevanten Ergebnisse sind:

1) Die Funktion der Immunglobulinrezeptoren als direkte Signalüberträger,
2) die bedeutende Funktion des Fc-Rezeptors als Überträger eines die Zellteilung hemmenden Regulationssignals,
3) die Trennung von Proliferations- und Differenzierungsinduktion durch Differenzierung von anti-Immunglobulin-aktivierten B-Lymphozyten.

Dieses System ist somit bis jetzt das einzige, das polyklonal B-Zellen zu von T-Zellhilfe abhängigen und darauf ansprechenden Zellen expandieren kann.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Stimulation von Maus B-Lymphozyten mit anti-Immunglobulinantikörpern wurde untersucht.

Es wurde gezeigt, daß sich B-Lymphozyten von wenigen Wochen alten Mäusen durch anti-IgM- bzw. anti-kappa - Antikörper direkt und ohne Beteiligung von T-Zellen oder adhärenten Zellen polyklonal zur Proliferation aktivieren lassen.

Diese Proliferationsinduktion steht unter der Kontrolle eines negativen feedback-Signals, das über den Fc-Rezeptor der Zelle übermittelt wird. Das Signal kommt durch gleichzeitige Bindung des anti-Immunglobulinantikörpers an Immunglobulinrezeptor und Fc-Rezeptor der Zelle zustande. Verhindert man, wie auf verschiedene Arten gezeigt, eine Bindung des Fc-Teiles des anti-Immunglobulin - Antikörpers mit dem Fc-Rezeptor des B-Lymphozyten, kommt die stimulierende Wirkung durch Interaktion mit dem Immunglobulinrezeptor der Zelle voll zum Tragen.

Auch eine Proliferationsinduktion über den IgD-Rezeptor der B-Zelle mit Hilfe von anti-IgD - Antikörpern konnte nachgewiesen werden. Außerdem wurde gezeigt, daß anti-IgM-, anti-kappa-, anti-IgD - Antikörper und das B-Zellmitogen LPS unterschiedliche, jedoch nicht scharf trennbare Subpopulationen von B-Lymphozyten aktivieren.

Mit Hilfe von anti-Immunglobulin - Antikörpern war es möglich, Proliferationsinduktion und Differenzierungsinduktion experimentell zu trennen. Anti-Immunglobulin - Antikörper induzieren nur eine reine Proliferation. Die so aktivierten B-Lymphozyten werden durch anti-Immunglobulin in ähnlicher Weise wie durch ein spezifisches Antigen aktiviert und können mit der entsprechenden T-Zellhilfe zur Immunglobulinproduktion differenziert werden.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1) Schimpl, A. and Wecker, E.:
Transplant. Rev. 23, 176 (1975)

2) Schimpl, A. and Wecker, E.:
Nature New Biol. 237, 15 (1972)

3) Schimpl, A. and Wecker, E.
J. Exp. Med. 137, 547 (1973)

4) Hünig, Th., Schimpl, A. and Wecker, E.:
J. Exp. Med. 145, 1216 (1977)

5) Hünig, Th., Schimpl, A. and Wecker, E.:
J. Exp. Med. 145, 1228 (1977)

6) Schimpl, A., Hünig Th. and Wecker, E.:
In: Progress in Immunology II, L. Brent and J. Holborow, eds. North Holland Publ. Co. 2, 135 (1974)

7) Askonas, B.A., Schimpl, A. and Wecker, E.:
Eur. J. Immunol. 4, 164 (1974)

8) Pearson, T., Galfré, G., Ziegler, A., Milstein, C.:
Europ. J. Immunol. 7, 684 (1977)

9) Kishimoto, T.D. and Ishizaka, K.:
J. Immunol. 114, 585 (1975)

10) Sell, S., Asofsky, R.:
Progr. Allergy 12, 86 (1968)

11) Greaves, M., Janossy, G., Feldmann, M., Doenhoff, M.:
In: "The Immune System: Genes, Receptors, Signals"
(E.E. Sercarz, A.R. Williamson, C.F. Cox, Eds.)
Academic Press, New York (1974) p. 271

12) Möller, G.:
Transplant. Rev. 23, 126 (1975)

13) Parker, D.C.:
Nature 258, 361 (1975)

14) Weiner, H.L., Moorhead, J.W., and Claman, H.N.:
J. Immun. 116, 1656 (1976)

15) Möller, G.:
In: "The Immune System: Genes, Receptors, Antibodies"
(E.E. Sercarcz, A.R. Williamson and C.F. Cox, Eds.)
Academic Press, New York (1976)

16) Dulbecco, R., Vogt, P.:
J. Exp. Med. 99, 167 (1954)

17) Melchers, F.:
personal communication

18) Alexander, E.L. and Sanders, Sh.K.:
J. Immunol. 119, 1084 (1977)

19) Lees, R.K. and Sinclair, N.R.St.C.:
Cell. Immunol. 17, 525 (1975)

20) Sidman, C.L. and Unanue, E.R.:
J. Exp. Med. 144, 882 (1976)

21) Ly, I.A., Mishell, R.I.:
J. Immunol. Methods 5, 239 (1974)

22) Jerne, N.K., Nordin, A.A.:
Science (Wash.) 140, 405 (1963)

23) Berman, M., Weigle, W.O.:
J. Exp. Med. 146, 241 (1977)

24) Laemmli, U.K.:
Nature 227, 680 (1976)

25) Mishell, R., Dutton, R.W.:
J. Exp. Med. 126, 423 (1967)

26) Hünig, Th., Schimpl, A. and Wecker, E.:
J. Exp. Med. 139, 754 (1974)

27) Greaves, M.F., Owen, J.J.T., Raff, M.C.:
T and B lymphocytes
Excerpta Medica Amsterdam (1974)

28) Warner, N.L.:
Advan. Immunol. 19, 67-216 (1974)

29) Siskind, G.W., Benaceraff, B.:
Advan. Immunol. 10, 12-20 (1969)

30) Janeway, C.A., Sharrow, S.O., Simpson, E.:
Nature 253, 544 (1975)

31) Feldmann, M., Beverly, P.C.L., Dunkley, M.,
Kontiainen, S.:
Nature 258, 414 (1975)

32) Basten, A., Miller, J.F.A.P., Sprent, J., Pye, J.:
J. Exp. Med. 135, 610 (1972)

33) Dukar, P., Bianco, C., Nussenzweig, V.:
Eur. J. Immunol. 1, 491 (1971)

34) Takahashi, T., Old, L.J., Boyse, E.A.:
J. Exp. Med. 131, 1325 (1970)

35) Takahashi, T., Old, L.J., Chen-Jung, N., Boyse, E.A.:
Eur. J. Immunol. 1, 478 (1972)

36) Snell, G.D., Cherry, M., McKenzie, I.F.C., Bailey, D.W.:
PNAS 70, 1108 (1973)

37) Raff, M.C., Nasc, S., Mitchison, N.A.:
Nature 230, 50 (1971)

38) Vitetta, E.S., Uhr, J.W.:
Immunol. Rev. 37, 50 (1977)

39) Goding, J.W., Scott, D.W., Layton, J.E.:
Immunol. Rev. 37, 152 (1977)

40) Coffman, R.C., Cohn, M.:
J. Immunol. 118, 1806 (1977)

41) Zan-Bar, I., Strober, S., Vitetta, E.S.:
J. Exp. Med. 145, 1187 (1977a)

42) Zan-Bar, I., Vitetta, E.S., Strober, S.:
J. Exp. Med. 145, 1206 (1977b)

43) Zan-Bar, I., Vitetta, E.S., Assisi, F., Strober, S.:
J. Exp. Med. 149, 1374 (1978)

44) Black, S.J., van der Loo, W., Loken, M.R., Herzenberg, L.A.:
J. Exp. Med. 149, 987 (1978)

45) Kearney, J.F., Cooper, M.D., Klein, J., Abney, E.R.,
Parkhouse, R.M., Lawton, A.R.:
J. Exp. Med. 146, 297 (1977)

46) Vitetta, E.S., Pure, E., Isakson, P., Buck, L., Uhr, J.:
Immunol. Rev. 52, 211 (1980)

47) Grov, A., Myklestad, B., Oeding, P.:
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 61, 588 (1964)

48) Kronvall, G., Frommel, D.:
Immunochemistry 7, 124 (1970)

49) Möller, G.:
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 41,
217 (1977)

50) Möller, G.:
Scand. J. Immunol. 8, 469 (1978)

51) Mongini, P., Friedman, S., Wortis, H.:
Nature 276, 709 (1978)

52) Hattori, M., Scribner, D.J., Moorhead, J.W.:
Nature 280, 316 (1979)

53) Scribner, D.J., Weiner, H.L., Moorhead, J.W.:
J. Immunol. 121, 377 (1978)

54) Ryan, J.L., Henkart, P.A.:
J. Exp. Med. 144, 768 (1976)

55) Jerne, N.K.:
Ann. Immunol. Inst. Pasteur 1250, 373 (1974)

56) Oberbarnscheidt, J., Kölsch, E.:
Immunology 35, 151 (1978)

57) Stockinger, R., Lemmel, E.:
Cell. Immunol. 40, 395 (1978)

58) Cambiaso, C.L., Goffinet, A., Vaerman, J.-P.,
Heremans, J.F.:
Immunochemistry 12, 273 (1975)

59) Sieckmann, D.G., Habbersett, R., Scher, I., Paul, W.E.:
J. Immunol. 127, 205 (198)

60) Molinaro, G.A., Maron, E., Eby, W.C., Dray, S.:
Eur. J. Immunol. 5, 771 (1975)

61) Gronowicz, E., Coutinho, A., Melchers, F.:
Eur. J. Immunol. 6, 588 (1976)

62) Sieckmann, D.G., Asofsky, R., Mosier, D.E., Zitron, I.M.,
Paul, W.E.:
J. Exp. Med. 147, 814 (1978)

63) Sidman, C.L., Unanue, E.R.:
PNAS 75, 2401 (1978)

64) Conahey, P.J., Dixon, E.J.:
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 29, 185 (1966)

65) Dörries, R., ter Meulen, V.:
Med. Microbiol. Immunol. 168, 159 (1980)

66) Maizel, I.V. Jr.:
Methods in Virology (Maromorosh, K., Koprowski, H. Eds.)
Acad. Press, New York 5, 180 (1971)

67) Gillis, S., Union, N.A., Baker, P.E., Smith, K.A.:
J. Exp. Med. 149, 1460 (1979)

68) Julius, M.H., Simpson, E., Herzenberg, L.A.:
Eur. J. Immunol. 3, 645 (1973)

69) Stanworth, D.R., Turner, M.W.:
In: Weir, D.M. (Ed.) Handbook of Experimental Immunology, 3rd edition vol. 1
Blachwell Scientific Publications Oxford 1978 chapter 6

70) Hämmerling, U., Chin, A.F., Arny, M.:
Europ. J. Immunol. 4, 314 (1974)

71) Nossal in "Molekularbiologie des Gens" von J.D. Watson,
Inter European Editions, Amsterdam 1975, S. 538

72) Anderson, J., Sjöberg, O., Möller, G.:
Transpl. Rev. 11, 131 (1972a)

73) Miller, J.F.A.P., Mitchell, G.F.:
J. Exp. Med. 128, 801 (1968)

Frau Professor Dr. Anneliese Schimpl und Herrn Professor Dr. Eberhard Wecker danke ich für ihre ständige Diskussionsbereitschaft, ihre wissenschaftliche Anleitung und ihr Interesse am Fortgang der Arbeit.

Diese Arbeit wurde aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Sonderforschungsbereich 105) gefördert.

L e b e n s l a u f

16.9.1955	geboren in Bad Mergentheim Vater: Hans Tony, Verwaltungsdirektor Mutter: Berta Tony geb. Ruf
1962-1966	Besuch der Grundschule in Bad Mergentheim
1966-1974	Besuch des Deutschordengymnasiums in Bad Mergentheim
22.6.1974	Reifezeugnis
1974-1975	Studium der Chemie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
1975-1981	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
1977-1981	Anfertigung des experimentellen Teiles der Dissertation am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg
1979	Eheschließung mit Charlene Tony geb. Schömig
26.5.1981	Erteilung der Approbation als Arzt
seit Aug. 1981	Ableistung des Grundwehrdienstes

Hans-Peter Tony

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80